

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
20 octobre 2005 (20.10.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/097179 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 39/21, C07K 14/16, C12N 15/49

(74) Mandataire : CABINET ORES; 36 rue de St Péters-
bourg, F-75008 PARIS (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/000795

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(22) Date de dépôt international : 1 avril 2005 (01.04.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0403429 1 avril 2004 (01.04.2004) FR

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : COM-
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR];
31-33 rue de la Fédération, F-75015 PARIS (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : DREVET,
Pascal [FR/FR]; 30 rue Ernest Cousseran, F-91470
LIMOURS (FR). LAJEUNESSE, Evelyne [FR/FR];
16 avenue Fernand Fenzy, F-92160 ANTONY (FR).
LECOQ, Alain [FR/FR]; 9 Place des Rouges Gorges,
F-91540 MENNECY (FR). LEONETTI, Michel [FR/FR];
6 rue Claude Monet, F-91620 NOZAY (FR). MENEZ,
André [FR/FR]; 102 rue Claude Nicolas Ledoux,, Cres-
sely, F-78114 MAGNY LES HAMEAUX (FR). MOINE,
Gervaise [FR/FR]; 40 rue Gérard de Nerval, F-78180
MONTIGNY LE BRETONNEUX (FR). THAI, Robert
[FR/FR]; 6 rue Paul Cézanne, F-91620 NOZAY (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: STABILISED TAT ANTIGEN AND THE USE THEREOF FOR ANTI-HIV VACCINATION

(54) Titre : ANTIGENE TAT STABILISE ET SES APPLICATIONS POUR LA VACCINATION ANTI-VIH.

(57) Abstract: The invention relates to a vaccine composition comprising at least one type of anti-HIV vaccine composition con-
taining at least one type of stabilised Tat antigen and to the use thereof for preventing and/or treating a human HIV infection.

(57) Abrégé : La présente invention est relative à une composition vaccinale comprenant au moins une composition vaccinale
anti-VIH comprenant au moins un antigène Tat stabilisé, ainsi qu'à ses applications pour la prévention et/ou le traitement d'une in-
fection par le VIH chez l'Homme.

WO 2005/097179 A2

ANTIGENE TAT STABILISE ET SES APPLICATIONS POUR LA VACCINATION ANTI-VIH

La présente invention est relative à un antigène Tat stabilisé et à ses applications pour la vaccination anti-VIH.

5 Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) est une maladie sexuellement transmissible provoquée par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH de type 1 (VIH-1) ou de type 2 (VIH-2)). Cette maladie est en progression constante et à ce jour plus de 42 millions de personnes sont infectées dans le monde. C'est pourquoi la mise au point d'un vaccin représente une urgence absolue pour lutter
10 contre cette pandémie.

De nombreuses approches vaccinales ont été développées depuis près de vingt ans sans aboutir à la mise au point d'un vaccin efficace. Cependant, la connaissance toujours plus approfondie du cycle infectieux et des protéines virales responsables de la progression vers le stade SIDA a ouvert la voie vers l'utilisation de
15 nouvelles cibles vaccinales prometteuses : les protéines régulatrices du VIH. Ces protéines, qui avaient tout d'abord été délaissées, font depuis quelques années l'objet de nombreux travaux en raison de leur rôle dans la réplication virale.

Parmi ces protéines, le régulateur transcriptionnel Tat du VIH, représente une cible vaccinale particulièrement intéressante, dans la mesure où
20 l'absence de progression vers le stade SIDA est corrélée à la présence d'anticorps anti-Tat de haut titre et de cellules cytotoxiques spécifiques (Zagury et al., J. Hum. Virol., 1998,1 : 282-292 ; Re et al., J. Clin. Virol., 2001, 21 : 81-89 ; Van Baalen et al., J. Gen. Virol., 1997, 78: 1913-1918).

Le gène *Tat* comprend 2 exons codant pour une protéine de 99 à
25 103 acides aminés selon les souches de VIH. L'exon 1 qui code pour les 72 premiers acides aminés, possède une activité de transactivation totale, et comprend 5 domaines : (1) le domaine N-terminal (positions 1 à 21), qui est important pour l'interaction avec des protéines cellulaires, (2) le domaine riche en cystéines (positions 22 à 37) contenant 7 résidus de cystéine (positions 22, 25, 27, 30, 31, 34 et
30 37) parmi lesquelles 6 sont fortement conservées, impliqué dans la transactivation, (3) le domaine central (core) correspondant aux positions 38 à 48, également impliqué dans la transactivation, (4) le domaine basique (positions 49 à 57), qui

comprend les séquences impliquées dans la localisation nucléaire, le transport transcellulaire et la liaison à l'élément de réponse TAR (*Trans-activation response*) du LTR (*Long Terminal Repeat*) viral, et qui est également impliqué dans la liaison de Tat à l'héparine, et (5) le domaine riche en glutamines (positions 50 à 72). L'exon 2 de taille variable, code pour le domaine C-terminal (positions 73 à extrémité C-terminale) qui ne possède pas d'activité de transactivation mais contient le motif RGD (arginine-glycine-aspartate ; positions 78 à 80), nécessaire pour la liaison de Tat aux récepteurs des intégrines.

Outre la protéine Tat de 99 à 103 acides aminés, il existe également une protéine Tat tronquée de 86 acides aminés, produite *in vitro* par génération d'un codon stop en position 87, du fait de la mutation du VIH, lors du passage en culture cellulaire.

Il a été montré que la protéine Tat recombinante ou synthétique, isolée et purifiée, s'associe en solution pour former des oligomères (dimères et trimères) très stables, particulièrement résistants à la dénaturation et à la réduction (100 mM DTT ; Tosi et al., Eur. J. Immunol., 2000, 30 : 1120-1126). Ainsi, les préparations de Tat sont hétérogènes et comprennent un mélange de monomères, de dimères et de trimères (Demande de Brevet US 2003/0158134). Néanmoins, la nature exacte des interactions impliquées dans la formation des oligomères de Tat n'est pas connue ; l'existence de ponts disulfures impliquant notamment la cystéine en position 37 ou d'autres interactions chimiques fortes, impliquant notamment des cations polyvalents, de préférence divalents (zinc, cadmium) a été suggérée (Battaglia et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994, 201 : 701-708 ; Frankel et al., Science, 1988, 240 : 70-73 ; Huang et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1996, 227 : 615-621 ; Misumi et al., Aids Research and Human Retroviruses, 2004, 20 : 297-304).

Tat est un facteur de transcription essentiel à la réplication virale, (Fisher et al., Nature, 1986, 320:367-371) qui peut à la fois activer le VIH latent et déréguler l'expression d'autres gènes cellulaires, dans la mesure où il possède la particularité d'être libéré par les cellules infectées et incorporé dans d'autres cellules infectées ou non (transport transcellulaire ; Ensoli et al., J Virol, 1993, 67:277-287 ; Chang et al., Aids, 1997, 11:1421-1431). Il a été montré que Tat a des effets toxiques *in vitro*. Ces effets comprennent : la dérégulation des signaux cellulaires impliqués

dans l'apoptose, la dérégulation de l'expression de parties de gènes du système immunitaire tel que le gène de l'interleukine 2 et de l'interféron alpha, ou des gènes codant pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II, et/ou l'induction d'angiogénèse.

5 Le rôle relatif des différentes formes de Tat dans l'infection virale n'a pas été élucidé et leur rôle dans l'immunité anti-virale n'a pas été étudié. En effet, il semblerait que les oligomères de Tat ne possèdent aucune activité biologique dans la mesure où, d'une part la protéine Tat extracellulaire produite à partir de cellules de mammifère est monomérique et que, d'autre part l'inhibition de l'activité transacti-
10 vatrice de Tat à l'aide d'anticorps reconnaissant spécifiquement les différentes formes de Tat, indique que seul le monomère est capable d'entrer dans les cellules et de transactiver le LTR viral (Rice et al., Virology, 1991, 185 : 451-454 ; Tosi et al., précité).

Ainsi, Tat possède de nombreuses activités biologiques et pourrait
15 jouer un rôle, tant dans la dissémination virale que dans la pathogenèse : progression vers le stade SIDA et pathologies associées au SIDA, comme le sarcome de Kaposi.

En conséquence, bien qu'une protéine Tat non-modifiée, biologiquement active soit capable de protéger des singes contre l'infection par le VIH-1 (Cafaro et al., Nat. Med., 1999, 5 : 643-650), il n'est pas envisageable d'utiliser une
20 protéine toxique en tant qu'immunogène pour la vaccination humaine.

C'est pourquoi, diverses approches ont été envisagées pour obtenir des dérivés de Tat biologiquement inactifs, qui puissent être utilisés en tant que vaccin chez l'homme.

L'inactivation a principalement porté sur l'élimination de l'aptitude
25 de Tat à transactiver la transcription du génome viral puis sur d'autres activités, comme l'inhibition de la suppression de la prolifération des cellules T. Ces travaux ont abouti à la découverte de dérivés biologiquement inactifs de Tat, obtenus par :

- mutations dans la séquence du gène *Tat* : (i) délétions des extrémités -NH₂ ou -COOH, ou bien délétion ou substitution des résidus de cystéine
30 (Demande Internationale WO 95/31999), (ii) substitution conservative de tous les résidus de cystéine du domaine riche en cystéines (cystéine → sérine ; Demande Internationale WO 03/054006), (iii) substitution d'au moins deux résidus d'acide aminé

des positions 49 à 72 et/ou 73 à 101, en particulier des positions 49 à 57 (K51T, R52L, R55L, R57L), du domaine RGD (G79A) ou des positions 88 à 92 (K89L, E92Q), et éventuellement de la cystéine en position 27(C27S), (Demande Internationale WO 03/057885), et (iv) délétion d'un résidu d'acide aminé (C22, T23, N24, Y26, K28/29, C30, C31, F32, K33, E35, F38, K41, Y47, A57) ou substitution d'un résidu d'acide aminé (T23A, N24A, C22G, K41T ; Demande Internationale WO 99/27958),

- analyse des mutations du gène *Tat* naturellement présentes chez les individus séropositifs non-progresseurs : variants de la région N-terminale ou de l'exon 2 (Demande Internationale WO 01/12220) ; variant issu de l'isolat Oyi, possédant la substitution C22S (Demande Internationale WO 00/61067),

- traitements chimiques ou physiques de la protéine Tat : (i) traitement par une aldéhyde comme la formaldéhyde et la glutaraldéhyde (Demande Internationale PCT WO 96/27389), (ii) carboxyméthylation des cystéines à l'aide d'acide iodoacétique ou d'iodoacétamide (Demande Internationale PCT WO 99/33872), et (iii) oxydation, notamment par le peroxyde d'hydrogène ou le periodate de sodium ou bien irradiation (Demande de brevet US 2003/0215797 ; Demande Internationale WO 01/12220 ; Cohen et al., P.N.A.S., 1999, 96 : 10842-10847), et

- purification de la protéine Tat recombinante par un procédé permettant l'élimination de l'ARN et de l'endotoxine contaminants (Demande Internationale PCT WO 03/073984).

Il a en particulier été montré qu'un dérivé de Tat dont les cystéines 22 et 37 sont substituées par des sérines est immunogène (Caselli et al., J. Immunol., 1999, 162 : 5631-5638) et qu'un dérivé carboxyméthylé de Tat est immunogène et capable d'induire un ralentissement de la progression de la maladie chez le singe (Pauza et al., P.N.A.S., 2000, 97, 3515-3519).

Ces résultats indiquent qu'un immunogène Tat biologiquement actif ou préalablement inactivé peut contribuer à la mise en place d'un vaccin anti-VIH efficace. Cependant l'efficacité d'un vaccin dépend en grande partie de sa capacité à induire une forte réponse immunitaire. Or, la molécule Tat est connue pour ses capacités immunosuppressives (Cohen et al., précité) et est faiblement immunogène chez l'animal, en particulier, chez le singe. Ainsi, le ralentissement de la maladie induit par le toxoïde de Tat carboxyméthylé nécessite une série de 5 immunisations (Pauza et al.,

P.N.A.S., 2000,97 : 3515-3519) et la protection procurée par la molécule Tat biologiquement active a été obtenue après une série de 9 à 10 immunisations, selon les protocoles (Cafaro et al., précité).

En conséquence, pour mettre au point un vaccin efficace contre le
5 VIH, il existe un réel besoin de développer un antigène dérivé de Tat présentant une immunogénicité augmentée par rapport à celle des antigènes Tat de l'art antérieur.

Les Inventeurs se sont donnés pour but, la mise au point d'un tel antigène.

Les Inventeurs ont montré que de façon surprenante, la protéine Tat
10 était très instable et rapidement dégradée par les enzymes protéolytiques. La mise en évidence de cette caractéristique de Tat les a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle l'amélioration de la stabilité de Tat devrait diminuer sa susceptibilité protéolytique et augmenter sa demi-vie dans l'organisme, ainsi que son immunogénicité. Cette hypothèse a été validée en comparant l'immunogénicité de Tat non-modifiée à
15 celle de Tat préalablement stabilisée, soit par formation d'un complexe avec un ligand, soit par incorporation de groupements hydrophobes. Par comparaison avec Tat non-modifiée ou un toxoïde de Tat dont les cystéines sont bloquées par des groupements acétamidométhyle qui sont peu immunogènes, les dérivés stabilisés de Tat induisent des titres en anticorps anti-Tat au moins 10 fois plus élevés chez l'animal
20 (facteur 10 à 35) et sont capables d'induire une réponse cellulaire spécifique de Tat. En outre, ces dérivés présentent une activité transactivatrice altérée indiquant une absence de toxicité.

La présente invention a en conséquence pour objet, une composition vaccinale anti-VIH, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un antigène Tat
25 stabilisé, résistant à la dégradation protéolytique, lequel antigène Tat stabilisé étant sélectionné dans le groupe constitué par :

a) un complexe entre une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, et un ligand non-métallique de Tat,

b) une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11
30 acides aminés, modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou la modification par un groupement hydrophobe, d'au moins un acide aminé de la séquence de

Tat, à l'exclusion des substitutions R52L, R55L, R57L, R78A, G79A, E80A et K89L, et

- c) un complexe entre la protéine Tat ou le fragment de Tat modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou la modification par un groupe-
5 ment hydrophobe, d'au moins un acide aminé de la séquence de Tat définis en b), et un ligand non-métallique de Tat.

La combinaison des deux modifications en c) permet avantageusement d'obtenir une augmentation de l'immunogénicité de Tat supérieure (d'au moins un facteur cinq), à celle obtenue avec une seule des modifications, en a) ou en b).

10 Définitions

- On entend par antigène Tat, un monomère ou un oligomère, notamment un dimère d'une protéine Tat ou d'un fragment de cette protéine d'au moins 11 acides aminés, capable d'induire une réponse humorale et/ou cellulaire spécifique chez un mammifère humain ou animal ; ledit antigène Tat est, soit biologiquement actif, soit inactivé par mutation de la séquence du gène *Tat*, notamment par la
15 substitution en sérine(s), de résidu(s) de cystéine de la région riche en cystéines, ou bien par traitement physique (irradiation) ou chimique (action d'une aldéhyde, oxydation) de Tat, comme défini ci-dessus.

- On entend par oligomère de Tat, l'association de monomères de
20 Tat (protéine et/ou fragment) identiques ou différents entre eux (homo- ou hétéro-oligomères), par une ou plusieurs liaisons covalentes et/ou non covalentes. Les oligomères covalents résultent notamment de la formation de pont(s) disulfure(s) par oxydation de résidus de cystéine ou de la formation d'autre liaison(s) chimique(s) (oxime, hydrazone), ou bien encore de la réaction avec des groupements homobifonctionnels tels que la glutaraldéhyde ou hétéro-bifonctionnels tels que le 3-((2-aminoéthyle)dithio) propionique hydrochloride. Les oligomères non-covalents peuvent
25 être formés par l'intermédiaire de motifs du type leucine-zipper ou d'ions métalliques, comme le zinc ou le cadmium.

- On entend par protéine Tat (ou Tat), la protéine Tat de n'importe
30 quelle souche de VIH (VIH-1 ou VIH-2), correspondant à une séquence d'environ 86 à 103 acides aminés, selon les souches.

- On entend par ligand non-métallique de Tat, un composé autre qu'un ion métallique, qui est capable de se lier à Tat ou à un fragment de Tat ; il peut être de nature protéique, lipidique, glucidique, nucléotidique (ADN, ARN) ou mixte (glycolipide, glycoprotéine). Il inclut notamment : la protéine Vpr du VIH ; les sucres polysulfatés comme par exemple : le sulfate de dextran, le pentosane polysulfate et les glycosaminoglycans polysulfatés, notamment l'héparine, l'héparane sulfate et les composés tels que décrits dans Rusnati et al., J. Biol. Chem. 1998, 273 : 16027-16037.

- On entend par ligand métallique de Tat, les ions métalliques, notamment les cations polyvalents, de préférence divalents, tels que le zinc (Zn^{2+}) et le cadmium (Cd^{2+}).

- On entend par antigène Tat stabilisé, un dérivé de la protéine Tat ou du fragment de Tat tels que définis ci-dessus, comprenant une modification physique ou chimique telle qu'après 2 heures de digestion par la chymotrypsine (rapport enzyme/substrat de 1/50 (P/P)), la proportion de dérivé de Tat reconnue par un anticorps monoclonal anti-Tat dirigé contre l'épitope (KGLGISYGRK) de la région du core est au moins 20% plus importante, de préférence au moins 50 % plus importante, que la proportion de Tat non-modifiée reconnue par le même anticorps, suite à la même digestion enzymatique.

- On entend par acide aminé hydrophobe, soit un acide aminé naturel choisi parmi : L (leucine), V (valine), I (isoleucine), A (alanine), M (méthionine), F (phénylalanine), W (tryptophane) ou Y (tyrosine), soit un acide aminé non protéino-génique, dont le carbone portant la chaîne latérale R, à savoir le groupe -CHR-, situé entre -CO- et -NH- dans la chaîne peptidique naturelle, est remplacé par un motif n'entrant pas dans la constitution d'une protéine ou d'un peptide naturel. A titre d'exemple non-limitatif, on peut citer la Norleucine (Nle) et la cyclohexaalanine (Cha).

- On entend par groupement hydrophobe, un alkyle ou un aryle tel que par exemple : S-tertio-butyle, néopentyle, isobutyle, isopropyle, 1-méthylpropyle, benzyle, indoyle ou un naphthyle. Ledit groupement hydrophobe peut-être introduit sur l'acide aminé à l'aide d'un réactif de type 1-iodo-2,2-diméthylpropane, α -bromotoluène, ter-butyle disulfure, N-ter-Butylacrylamide. Les résidus d'acides aminés de Tat ou du fragment de Tat qui sont modifiés par ledit groupement hydrophobe sont les

acides aminés polaires ou chargés qui peuvent être fonctionnalisés. Parmi ces acides aminés, on peut citer ceux possédant les fonctions réactives suivantes : -OH [sérine (S), thréonine (T) ou tyrosine (Y)], -SH [cystéine (C)], -NH₂ [lysine (K) ou arginine (R)], -COOH [acide aspartique (D) ou acide glutamique (E)].

5 Selon un mode de réalisation avantageux de ladite composition vaccinale, ledit ligand non-métallique de Tat est de nature protéique, lipidique, glucidique, nucléotidique ou mixte.

 Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation de ladite composition vaccinale, ledit ligand non-métallique est un sucre polysulfaté
10 choisi parmi : le sulfate de dextran, le pentosane polysulfate et les glycosaminoglycans polysulfatés tels que l'héparine et l'héparane sulfate.

 De préférence, ledit complexe Tat/sucre polysulfaté, par exemple un complexe Tat/héparine, est un complexe équimolaire.

 De préférence, ladite héparine est une héparine de poids moléculaire
15 de 15 000 Da ou un fragment d'héparine de poids moléculaire de 6000 Da, qui se lie à Tat avec une affinité élevée.

 Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de réalisation de ladite composition vaccinale, ledit ligand non-métallique de Tat est la protéine Vpr du VIH.

20 Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition vaccinale, ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat sont modifiés par substitution et/ou la modification de 1 à 7 cystéines, situées en positions 22, 25, 27, 30, 31, 34 et/ou 37.

 De préférence, ladite cystéine est modifiée par un groupement S-
25 tertio-butyle (CysStBu) ou substituée par un acide aminé hydrophobe sélectionné dans le groupe constitué par : une leucine, un tryptophane et une phénylalanine. De manière préférée, au moins les quatre cystéines en position 25, 27, 30 et 31 sont substituées par un acide aminé hydrophobe et/ou modifiées par un groupement hydrophobe tel que défini ci-dessus.

30 Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition vaccinale, ledit antigène Tat stabilisé dérive d'une protéine Tat ou d'un fragment de Tat inactivés (antigène Tat inactivé), comprenant de préférence la

substitution de chacune des cystéines en positions 22, 34 et 37 en sérines (TatC(22,34,37)S, ou bien la substitution de chacune des arginines en positions 52 et 53 en glutamines (TatR(52,53)Q). De manière préférée, il s'agit d'un antigène Tat dans lequel les cystéines en positions 22, 34 et 37 sont substituées en sérines et les
5 cystéines en positions 25, 27, 30 et 31 sont modifiées par un groupement S-tertio-butyle ou substituées par une leucine, un tryptophane ou une phénylalanine. Un tel antigène présente à la fois un pouvoir immunogène élevé et une absence de toxicité, indiquée par une absence de pouvoir transactivateur du LTR viral.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite
10 composition, ladite protéine Tat ou le fragment de ladite protéine sont choisis parmi : la protéine Tat de 101 acides aminés (Tat101), la protéine Tat de 86 acides aminés (Tat86), le fragment 1 à 57 de Tat et les fragments d'au moins 11 acides aminés inclus dans les protéines ou le fragment précédents, de préférence ceux comprenant de 11 à 50 acides aminés, de manière préférée ceux comprenant entre 11 et 35 acides aminés,
15 de manière encore plus préférée ceux comprenant entre 15 et 25 acides aminés.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition vaccinale, ledit antigène Tat stabilisé dérive de la protéine Tat de SEQ ID NO :1 ou d'un fragment d'au moins 11 acides aminés de cette protéine.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite
20 composition vaccinale, ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat en a) sont également complexés à un ligand métallique de Tat choisi parmi les cations polyvalents, de préférence divalents, tels que le zinc (Zn^{2+}) ou le cadmium (Cd^{2+}) ; le complexe de Tat en a) comprend ainsi, à la fois un ligand métallique et un ligand non-métallique.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite
25 composition vaccinale, ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat modifiés en b) ou en c) sont en outre complexés à un ligand métallique de Tat choisi parmi les cations polyvalents, de préférence divalents, tels que le zinc (Zn^{2+}) ou le cadmium (Cd^{2+}) ; les complexes de Tat modifiée en b) et en c) comprennent ainsi respectivement, un ligand non-métallique, et à la fois un ligand métallique et un ligand non-métallique.

30 Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition vaccinale, ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat sont des monomères.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition vaccinale, ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat sont des oligomères formés par l'association covalente et/ou non-covalente de monomères de Tat (protéine(s) et/ou fragment(s)), de préférence, il s'agit de dimères. Les oligomères
5 associés de façon covalente comprennent notamment, au moins une liaison disulfure intermoléculaire impliquant un résidu de cystéine de la séquence en acides aminés de Tat, en particulier une cystéine de la région riche en cystéines, de préférence l'une des cystéines en position 22, 34 ou 37. Conformément à l'invention, l'une au moins des cystéines qui n'est pas impliquée dans un pont disulfure, peut être substituée par un
10 groupement hydrophobe et/ou modifiée par un groupement hydrophobe tel que défini ci-dessus, les cystéines résiduelles étant par exemple substituées en un acide aminé ne comprenant pas de groupement sulfhydryle comme la sérine. Alternativement, les oligomères peuvent également être associés de façon non-covalente par l'intermédiaire d'ions métalliques comme le zinc ou le cadmium.

15 Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition vaccinale, la protéine Tat et/ou le fragment de Tat du complexe en a) ou c), ou bien la protéine Tat et/ou le fragment de Tat modifiés en b), sont sous la forme d'un polynucléotide ou d'un vecteur recombinant codant pour ladite protéine et/ou ledit fragment.

20 Les antigènes Tat stabilisés selon l'invention sont notamment représentés par :

a) un complexe entre une protéine Tat de 101 acides aminés (Tat101) ou de 86 acides aminés (Tat86) et un sucre polysulfaté tel que le sulfate de dextran, le pentosane polysulfate et l'héparine, notamment un complexe équimolaire, par exemple
25 un complexe avec une héparine de poids moléculaire de 15000 Da ou un fragment d'héparine de poids moléculaire de 6000 Da,

b) une protéine Tat de 101 acides aminés (Tat101) ou de 86 acides aminés (Tat86) comprenant une cystéine modifiée par un groupement S-tertio-butyle en positions 22, 25, 27, 30, 31, 34 et 37,

30 c) une protéine Tat de 101 acides aminés (Tat101) ou de 86 acides aminés (Tat86) comprenant une sérine en positions 22, 34 et 37 et une cystéine modifiée par un groupement S-tertio-butyle en positions 25, 27, 30 et 31,

d) une protéine Tat de 101 acides aminés (Tat101) ou de 86 acides aminés (Tat86) comprenant une leucine, en positions 22, 25, 27, 30, 31, 34 et 37,

e) une protéine Tat de 101 acides aminés (Tat101) ou de 86 acides aminés (Tat86) comprenant une phénylalanine, en positions 22, 25, 27, 30, 31, 34 et
5 37,

f) une protéine Tat de 101 acides aminés (Tat101) ou de 86 acides aminés (Tat86) comprenant un tryptophane, en positions 22, 25, 27, 30, 31, 34 et 37,

g) un dimère de Tat formé de l'association par un pont disulfure entre les cystéines en position 34, de deux protéines Tat ou de deux fragments de Tat
10 modifiés, comprenant une sérine en positions 22 et 37 et une leucine en positions 25, 27, 30 et 31,

h) un complexe entre une protéine Tat ou un dimère de Tat tel que définis en b), c), d), e), f) ou g) et un sucre polysulfaté tel que le sulfate de dextran, le pentosane polysulfate ou l'héparine, notamment un complexe équimolaire, par
15 exemple avec une héparine de poids moléculaire de 15000 Da ou un fragment d'héparine de poids moléculaire de 6000 Da, et

i) un complexe entre un oligomère non-covalent de protéines Tat de 101 ou de 86 acides aminés et/ou de fragments de Tat, éventuellement inactivés et/ou modifiés tels que définis dans la présente invention, et un sucre polysulfaté tel que le
20 sulfate de dextran, le pentosane polysulfate ou l'héparine, dans lequel l'oligomère de Tat est formé par l'association non-covalente par l'intermédiaire d'ions Zn^{2+} . Il s'agit notamment d'un complexe équimolaire, par exemple avec une héparine de poids moléculaire de 15000 Da ou un fragment d'héparine de poids moléculaire de 6000 Da,

Selon encore un autre mode de réalisation de ladite composition
25 vaccinale, elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable, et/ou une substance porteuse, et/ou un adjuvant.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite composition vaccinale est constituée par un antigène stabilisé tel que défini ci-dessus et un véhicule pharmaceutiquement acceptable, et/ou une substance porteuse.

30 La composition vaccinale selon l'invention se présente sous une forme galénique adaptée à une administration par voie parentérale (sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse), entérale (orale, sublinguale), ou locale (rectale,

vaginale).

Les véhicules pharmaceutiquement acceptables, les substances porteuses et les adjuvants sont ceux classiquement utilisés.

Les adjuvants sont avantageusement choisis dans le groupe constitué
5 par : des émulsions huileuses, des substances minérales, des extraits bactériens, la saponine, l'hydroxyde d'alumine, le monophosphoryl –lipide A et le squalène.

Les substances porteuses sont avantageusement sélectionnées dans le groupe constitué par : les liposomes unilamellaires ou multilamellaires, les ISCOMS, les virosomes, les particules de type viral (*virus-like particles*), les micelles de
10 saponine, les microsphères solides de nature saccharidique (poly(lactide-co-glycolide)) ou aurifère, et les nanoparticules.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite composition vaccinale comprend de l'hydroxyde d'alumine.

Selon encore une autre disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite composition vaccinale comprend au moins un autre antigène du VIH,
15 notamment Rev, Nef, gag, gp 160 ou un fragment d'au moins 11 acides aminés desdits antigènes.

La présente invention a également pour objet un antigène Tat stabilisé tel que défini ci-dessus comme vaccin pour la prévention et/ou le traitement d'une
20 infection par le VIH chez l'homme.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un antigène Tat stabilisé tel que défini ci-dessus, pour la préparation d'un vaccin destiné à la prévention et/ou au traitement d'une infection par le VIH chez l'Homme.

La présente invention a également pour objet un complexe
25 peptidique, caractérisé en ce qu'il est constitué par :

- une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou la modification par un groupement hydrophobe d'au moins un acide aminé de la séquence de Tat, tels que définis ci-dessus, associés à
- 30 - un ligand métallique de Tat, et/ou un ligand non-métallique de Tat tels que définis ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une protéine ou fragment peptidique, caractérisés en ce qu'ils sont choisis parmi une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou la modification par un groupement hydrophobe d'au moins un acide aminé de la séquence de Tat, tels que définis ci-dessus, à l'exclusion des substitutions R52L, R55L, R57L, R78A, G79A, E80A et K89L.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'un antigène Tat stabilisé, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

- la préparation, par tout moyen approprié, d'une protéine Tat de VIH ou d'un fragment de Tat tels que définis ci-dessus, et de façon simultanée ou séquentielle,

- la formation d'un complexe avec un ligand de Tat tel que défini ci-dessus et/ou la substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou la modification par un groupement hydrophobe, d'au moins un des résidus d'acides aminés de la séquence de Tat, telle que définie ci-dessus.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un ion métallique, de préférence d'un cation polyvalent, de manière préférée d'un cation divalent, tel que Zn^{2+} et Cd^{2+} , pour stabiliser la protéine Tat de VIH ou un fragment d'au moins 11 acides aminés de Tat ; l'utilisation d'un ion métallique tel que défini ci-dessus stabilise Tat en la protégeant contre la dégradation protéolytique et en inhibant la formation de formes oligomériques covalentes.

La présente invention a également pour objet un polynucléotide (ADN ou ARN) ou un mélange de polynucléotides sélectionné dans le groupe constitué par :

a) un polynucléotide ou un mélange de polynucléotides comprenant la séquence codant pour une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés et la séquence codant pour un ligand peptidique de Tat, tels que définis ci-dessus, et

b) un polynucléotide comprenant la séquence codant pour une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe d'au moins un acide aminé de la séquence

de Tat tels que définis ci-dessus, à l'exclusion des substitutions R52L, R55L, R57L R78A, G79A, E80A et K89L.

Conformément à l'invention les séquences codantes de la protéine Tat et/ou du fragment de ladite protéine et du ligand peptidique de Tat sont incluses
5 dans un polynucléotide unique ou bien dans deux polynucléotides séparés.

La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant ou un mélange de deux vecteurs recombinant comprenant un insert constitué respectivement par, le polynucléotide défini en a) ou en b) et chacun des deux polynucléotides du mélange défini en a).

10 De préférence, ledit vecteur recombinant est un vecteur d'expression dans lequel ledit ou lesdits polynucléotides sont placés sous le contrôle d'éléments régulateurs de la transcription et de la traduction appropriés.

La présente invention a également pour objet des cellules procaryotes ou eucaryotes transformées par un vecteur recombinant ou un mélange de
15 vecteurs recombinants tels que définis ci-dessus.

De nombreux vecteurs dans lesquels on peut insérer un polynucléotide d'intérêt afin de l'introduire et de le maintenir dans une cellule hôte eucaryote sont connus en eux-mêmes ; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple répllication de la séquence d'intérêt, expression de cette séquence, maintien de la séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte), ainsi que de la
20 nature de la cellule hôte. On peut utiliser entre autres, des vecteurs viraux tels que les adénovirus, les rétrovirus, les lentivirus et les AAV, dans lesquels a été insérée préalablement la séquence d'intérêt. On peut également insérer le polynucléotide d'intérêt
25 dans la séquence codant pour une protéine de surface du vecteur, au niveau d'un site permettant l'exposition de l'antigène Tat, à la surface du vecteur ; on peut notamment insérer le polynucléotide codant pour Tat ou un fragment de Tat dans la séquence d'une protéine de capsid virale, de façon à exposer Tat à la surface des particules de virus recombinant.

30 On peut également introduire lesdits polynucléotides (isolés ou insérés dans un vecteur plasmidique) dans des cellules-hôtes, soit en utilisant des méthodes physiques telles que l'électroporation ou la microinjection, soit en les asso-

ciant à toute(s) substance(s) permettant le passage de la membrane plasmique, tels que des transporteurs comme les nanotransporteurs, des liposomes, des lipides ou des polymères cationiques. En outre, on peut avantageusement combiner ces méthodes, par exemple en utilisant l'électroporation associée à des liposomes.

5 Les polynucléotides, les vecteurs recombinants et les cellules transformées tels que définis ci-dessus, sont utiles notamment pour la production des antigènes Tat stabilisés selon l'invention ou comme vaccin pour la prévention et/ou le traitement d'une infection par le VIH chez l'Homme.

Les polynucléotides selon l'invention sont obtenus par les méthodes
10 classiques, connues en elles-mêmes, en suivant les protocoles standards tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA). Par exemple, ils peuvent être obtenus par amplification d'une séquence nucléique par PCR ou RT-PCR, par criblage de banques d'ADN génomique par hybridation avec une sonde homologue, ou bien par
15 synthèse chimique totale ou partielle. Les vecteurs recombinants sont construits et introduits dans des cellules hôtes par les méthodes classiques d'ADN recombinant et de génie génétique, qui sont connues en elles-mêmes.

La protéine Tat et ses fragments, ainsi que les complexes peptidiques dérivés et les protéines et les peptides modifiés, tels que définis ci-dessus, sont
20 préparés par les techniques classiques connues de l'Homme du métier, notamment par synthèse en phase solide ou liquide ou par expression d'un ADN recombinant dans un système cellulaire approprié (eucaryote ou procaryote).

De manière plus précise :

- la protéine Tat et ses fragments comprenant des acides aminés
25 modifiés par un groupement hydrophobe sont synthétisés en phase solide, selon la technique Fmoc, originellement décrite par Merrifield et al. (J. Am. Chem. Soc., 1964, 85: 2149-) (1964) et purifiés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse,

- la protéine Tat et ses fragments comprenant des acides aminés
30 substitués par des acides aminés hydrophobes sont produits à partir des ADNc correspondants, obtenus par tout moyen permettant d'introduire des mutations dans une séquence d'ADN, connu de l'homme du métier ; l'ADNc est cloné dans un vecteur

d'expression eucaryote ou procaryote et la protéine ou le fragment produits dans les cellules modifiées par le vecteur recombinant sont purifiés par tout moyen approprié, notamment par chromatographie d'affinité, et

- les complexes peptidiques sont préparés par mise en contact de ligand(s) de Tat avec Tat ou un de ses fragments dans des conditions permettant aux partenaires d'interagir.

Les antigènes Tat selon l'invention présentent les avantages suivants par rapport aux antigènes de l'art antérieur :

- du fait de leur stabilité accrue, ils sont plus immunogènes ; les titres en anticorps anti-Tat, chez l'animal, sont au moins 10 fois plus élevés que ceux obtenus par immunisation avec Tat non-modifiée ou le toxoïde de Tat dont les cystéines sont bloquées par des groupements acétamidométhyle,
- ils induisent à la fois une réponse humorale et cellulaire ; les études comparatives montrent que dans les mêmes conditions, Tat non-modifiée induit une faible réponse humorale mais n'est pas capable d'induire une réponse cellulaire,
- ils possèdent une altération de leur activité transactivatrice qui indique une absence de toxicité,
- ils sont homogènes (préparation par des procédés reproductibles) et bien définis.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de l'antigène Tat stabilisé de la présente invention, ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 illustre l'analyse dichroïque de la structure de Tat86 (■) et Tat101 (●). Chaque spectre est le résultat de quatre mesures dans la région UV lointain (190 nm-250 nm), obtenues à une résolution de 0,2 nm, avec un temps d'intégration de 0,5 sec et une bande passante de 2 nm, sur des échantillons de protéine Tat86 et Tat101 à la concentration de 15 µM en tampon phosphate de potassium 5 mM pH 7,0,
- la figure 2 illustre la cinétique de protéolyse de Tat101 ; la protéine Tat101 libre (TAT-101SH; 10 µg/100 µl) a été incubée à 37 °C en présence de trypsine (panneau supérieur) ou de chymotrypsine (panneau inférieur), en tampon

phosphate de potassium 50 mM, pH 7 (rapport enzyme/substrat 1/200 (P/P)). Les fragments peptidiques générés à différents temps de digestion (30 sec, 1 min, 2 min, 5 min et 6 min) sont matérialisés par des flèches indiquant les sites de clivage de la trypsine (acides aminés basiques : arginine (R) ou lysine (K)) ou de la chymotrypsine (acides aminés aromatiques : tyrosine (Y), phénylalanine (F) ou tryptophane (W) puis acides aminés aliphatiques hydrophobes : leucine (L) ou isoleucine (I), dans l'ordre préférentiel décroissant).

- la figure 3 illustre l'analyse comparative par chromatographie liquide haute performance en phase inverse du profil des peptides générés par digestion enzymatique de Tat101 (10 μ g/100 μ l) et de chacun des complexes équimolaires Tat101/héparine (correspondant à 10 μ g de Tat101 dans 100 μ l). La protéine Tat101 (*) et les complexes Tat101/Hep 3000 (●), Tat101/Hep 6000 (■) et Tat101/Hep 15000 (□) ont été incubés pendant 15 min à 37 °C en présence de trypsine, en tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7 (rapport enzyme/substrat 1/200 (P/P)). La flèche indique la position de Tat101 non-dégradée,

- la figure 4 illustre l'analyse comparative en ELISA, de l'immunogénicité de Tat101, Tat101/Hep15000 et Tat101/Hep6000 chez la souris BALB/c. Les valeurs indiquées correspondent à l'inverse du titre en anticorps, mesuré 14 jours et 28 jours après la dernière immunisation,

- la figure 5 représente le profil antigénique des sérums produits par immunisation de souris BALB/c avec Tat101(A) et Tat101/Hep6000 (B). Les sérums sont testés en ELISA vis-à-vis de 18 peptides chevauchants d'une longueur de 15 acides aminés, représentant la totalité de la séquence de Tat (peptides 1 à 18). Les valeurs d'absorbance sont exprimées en milli-unités de densité optique (mUDO),

- la figure 6 représente la cartographie peptidique des fragments générés par digestion avec la pronase E, de Tat86 libre (TAT86: panneau inférieur) ou Tat86 modifiée par des groupements S-tertio-butyle (TAT86 C(22-37)StBu : panneau supérieur). La digestion est réalisée 15 min à 37°C en tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7, avec un rapport enzyme/substrat de 1/20 (P/P) et un substrat Tat à la concentration finale de 10 μ g/20 μ l,

- la figure 7 représente la cartographie peptidique des fragments générés par digestion avec la pronase E, de Tat101 libre (TAT101: panneau inférieur)

ou Tat101 modifiée par des groupements S-tertio-butyle (TAT101 C(22-37)StBu : panneau supérieur). La digestion est réalisée 15 min à 37°C en tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7, avec un rapport enzyme/substrat de 1/20 (P/P) et un substrat Tat à la concentration finale de 10 µg/20 µl,

5 - la figure 8 illustre l'analyse comparative en ELISA, de l'immunogénicité de Tat101 et Tat101C(22-37)StBu chez la souris BALB/c. Les valeurs indiquées correspondent à l'inverse du titre en anticorps, mesuré 25 jours, 35 jours et 47 jours après la dernière immunisation,

- la figure 9 illustre l'analyse comparative en ELISA, de l'immunogénicité de Tat86, Tat86C(22-37)StBu, Tat86C(22-37)L et d'un toxoïde de Tat préparé par carboxamidation (Tat86C(22-37)Scam) chez la souris BALB/c. Les valeurs indiquées correspondent à l'inverse du titre en anticorps, mesuré 14 jours et 28 jours après la dernière immunisation.

- la figure 10 illustre l'analyse comparative en ELISA, de l'immunogénicité des dérivés Tat86C(22-37)S, Tat86C(22-37)F, Tat86C(22-37)W et Tat86C(22-37)L chez la souris BALB/c. Les valeurs indiquées correspondent à l'inverse du titre en anticorps, mesuré 14 jours et 28 jours après la dernière immunisation

- la figure 11 illustre l'analyse comparative en ELISA, de la liaison de Tat86, Tat86C(22-37)StBu et Tat86C(22-37)L, à l'héparine 6000. Les valeurs d'absorbance sont exprimées en milli-unités de densité optique (mUDO),

- la figure 12 illustre l'analyse comparative en ELISA, de l'immunogénicité de Tat86C(22-37)StBu et Tat86C(22-37)L, sous forme libre ou complexée à l'héparine. Les valeurs indiquées correspondent à l'inverse du titre en anticorps, mesuré 14 jours et 28 jours après la dernière immunisation.

- la figure 13 illustre l'analyse en ELISA, de l'immunogénicité de Tat101/Hep6000, Tat101C(22,34,37)S,C(25,27,30,31)StBu/Hep6000, Tat86/Hep6000, Tat86C(22-37)StBu/Hep6000 et Tat86C(22-37)L/Hep6000, en l'absence d'adjuvant, chez la souris SWISS (non-consanguine). Les valeurs indiquées correspondent à l'inverse du titre en anticorps, mesuré 14 jours après la dernière immunisation.

- la figure 14 illustre la réponse cellulaire induite par immunisation avec Tat86 (A), Tat86C(22-37)StBu (B) et Tat86C(22-37)StBu/Hep6000 (C). L'incorporation de thymidine tritiée par les splénocytes des souris immunisées a été mesurée après stimulation avec des concentrations croissantes de Tat (0,01 à 0,5 μ M).

5 - la figure 15 (A, B et C) illustre la diminution du pouvoir transactivateur des dérivés de Tat. Des cellules Hela transfectées par un plasmide rapporteur contenant le gène de la GFP sous le contrôle transcriptionnel du LTR du VIH-1 ont été incubées en présence de chloroquine et de Tat ou de dérivés de Tat.

10 - la figure 16 illustre l'analyse comparative en ELISA, de l'immunogénicité de Tat101, Tat101/PPS et Tat101/Dextran, chez la souris BALB/c. Les valeurs indiquées correspondent à l'inverse du titre en anticorps, mesuré 14 jours et 28 jours après une seule immunisation en présence d'hydroxyde d'alumine.

15 - la figure 17 illustre l'analyse comparative en ELISA, de l'immunogénicité, en l'absence d'adjuvant, de Tat101 et d'un dérivé inactivé (Tat101R(52,53)Q), complexés au Zn^{2+} et/ou à l'héparine, ou non complexés, chez la souris SWISS. Les valeurs indiquées correspondent à l'inverse du titre en anticorps, mesuré 14 jours et 28 jours après la dernière immunisation.

20 - la figure 18 illustre l'analyse par électrophorèse à l'aide d'un gel non réticulé, de l'effet de Zn^{2+} sur l'apparition des formes oligomériques de Tat. Tat101 (58 μ M finale) a été incubée dans du tampon PBS (pH 7,4), en présence de $ZnCl_2$ (en excès d'un facteur 6 par rapport aux cystéines de Tat) ou en l'absence de $ZnCl_2$, pendant différents temps (T), à température ambiante, sans agitation, dans le noir. A la fin de l'incubation, les échantillons ont été traités avec du maléimide (20 mM), de façon à bloquer les cystéines réactives et éviter la formation de ponts
25 disulfure lors de la dénaturation ou de la migration des échantillons dans le gel. Les échantillons ont ensuite été dénaturés en présence de SDS, à 95°C, pendant 7 minutes avant leur chargement sur le gel. Tat 101 incubée en l'absence de $ZnCl_2$ (Ligne 1 : T= 0 min ; Ligne 2 : T= 1 heure ; Ligne 3 : T= 24 heures ; Ligne 4 : T= 5 jours). Tat 101 incubée en présence de $ZnCl_2$ (Ligne 5 : T= 1 heure ; Ligne 6 : T= 5 jours).

30 - la figure 19 illustre l'absence d'effet sur le pouvoir de transactivation de Tat, de la stabilisation de Tat par Zn^{2+} . Des cellules Hela transfectées par un plasmide rapporteur contenant le gène de la GFP sous le contrôle transcriptionnel du

LTR du VIH-1 ont été incubées en présence de chloroquine et de différentes concentrations de Tat (nM), préalablement incubée avec ZnCl_2 , ou non-préincubée avec ZnCl_2 , puis la fluorescence cellulaire a été analysée en cytométrie de flux.

Exemple 1 : Préparation de Tat et de ses dérivés

5 La protéine Tat correspond à celle de l'isolat NDK du VIH-1 (Groenink et al., J. Virol., 1991, 65, 1968-1975), dont la séquence est présentée à la figure 2 (SEQ ID NO : 1). Cette protéine est dénommée ci-après Tat101. Par analogie, le fragment 1 à 86 de cette protéine, est dénommé ci-après Tat86 (SEQ ID NO : 2). L'isolat NDK du VIH-1 (SEQ ID NO : 1) représente la séquence consensus obtenue à
10 partir de 66 séquences d'isolats primaires de VIH-1 rapportées dans les bases de données SWISSPROT et TrEMBL entre 1999 et 2000.

1) Synthèse chimique de Tat et de ses dérivés S-tertio-butyle (TatStBu)

 La synthèse chimique de Tat est réalisée en phase solide sur un appareil APPLIED BIOSYSTEMS 433A, en utilisant la stratégie Fmoc/tert-butyle
15 connue de l'Homme du métier. Les sept résidus de cystéine de la région riche en cystéines sont protégés par un groupement S-tertio-butyle (S(tBu)). Brièvement, l'échelle de synthèse est de 1 mM, soit 500 mg de résine Fmoc-Asp(OtBu)-PAL-PEG-PS à 0,2 mmol/g pour Tat101, et 476 mg de résine Fmoc-Glu(OtBu)-PAL-PEG-PS à 0,21 mmol/g pour Tat86. 1 mM de chaque acide aminé protégé est utilisé à chaque
20 cycle de couplage. L'activation de chaque acide aminé Fmoc est réalisée en utilisant le couple dicyclohexylcarboiimide/1-hydroxy-7azabenzotriazole ; le couplage est réalisé en présence de 0,25M diisopropyléthylamine/N-méthyle pyrrolidone. Le clivage de la résine et la déprotection (1 h et 30 min) sont réalisés en mélangeant la résine séchée (sous vide pendant une nuit), à 10 ml d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA :
25 9,5)/triisopropylsilane (0,25)/eau (0,25 ; V/V/V). Après filtration sur fritté, le mélange réactionnel est précipité dans 100 ml de ter-butyle méthyle éther refroidi (4° C), centrifugé 15 minutes à 2500 tours/min. Le solide obtenu est dissous dans 50 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique à 15 %, puis lyophilisé. Le brut de synthèse obtenu est purifié par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse,
30 sur une colonne semi-préparative C4 (21x 250 mm, 5 μM , 300 Å JUPITER). La fraction homogénéisée pour chaque dérivé synthétisé (Tat86C(22-37)StBu et Tat101C(22-

37)StBu) est caractérisée, par sa composition en acides aminés et par spectrométrie de masse.

Une stratégie similaire a été utilisée pour produire un dérivé de Tat101 dans lequel les cystéines 22, 34 et 37 sont remplacées par des sérines et les
5 cystéines 25, 27, 30 et 31 sont protégées par un groupement S-tertio-butyle (Tat101C(22,34,37)S,C(25,27, 30, 31)StBu).

Tat86 et Tat101 sont obtenus à partir des dérivés précédents (Tat86C(22-37)StBu et Tat101C(22-37)StBu), par déprotection des groupements StButyle. Brièvement, 1 équivalent de protéine et 50 équivalents de dithiothréitol par
10 cystéine, sont dissous dans un tampon phosphate de sodium dégazé à 50 mM, pH 8,5, 6M urée, pour une concentration finale de 10^{-4} M. L'avancement réactionnel est suivi par chromatographie liquide haute performance (CHLP) en phase inverse, sur une colonne analytique C4 (15 cm x 416 mm, 5 μ M, 300 Å JUPITER). Après 2 heures, la réaction apparaît quantitative, le mélange réactionnel est acidifié jusqu'à pH 2 avec
15 une solution aqueuse de TFA/H₂O (50/50 ; V/V), puis diluée avec une solution aqueuse de TFA/H₂O (1/999 ; V/V) dans un volume final de 50 ml. Le mélange réactionnel est alors purifié par chromatographie liquide haute performance (CHLP) en phase inverse, sur une colonne semi-préparative C4 (25 cm x 10 mm, 5 μ M, 300 Å JUPITER). La fraction homogénéisée pour chaque dérivé synthétisé (Tat86 et Tat101)
20 est caractérisée, par sa composition en acides aminés, par spectrométrie de masse.

Une stratégie similaire à celle utilisée pour Tat101 et Tat86 a été utilisée pour synthétiser :

- 18 peptides chevauchants d'une longueur de 15 acides aminés, couvrant la séquence de Tat101,
- 25 - les dérivés de Tat86 dans lesquels chacune des sept cystéines de la région riche en cystéine est substituée en sérine (Tat86Ser, contrôle) ou en un acide aminé hydrophobe, tel qu'une leucine (Tat86C(22-37)), une phénylalanine (Tat86C(22-37)F) ou un tryptophane (Tat86C(22-37)W),
- le dérivé de Tat 101 dans lequel chacune des arginines en positions
30 52 et 53 est substituée en glutamine (Tat101R(52,53)Q).

2) Production de la protéine Tat recombinante et des mutants dérivés

La production de la protéine Tat recombinante (Tat86 et Tat101) et de ses mutants a été réalisée chez *E. coli*. Brièvement, la séquence nucléotidique de la protéine Tat a été reconstituée à partir de 8 amorces nucléotidiques synthétiques
5 chevauchantes, représentant la séquence de la totalité du gène *Tat* codant pour la protéine précitée, flanquée des sites de restrictions *Nde* I et *Hind* III. Les amorces ont été hybridées par leurs régions complémentaires puis le produit d'hybridation obtenu a été amplifié par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), à l'aide des amorces ci-dessus, correspondant aux extrémités 5' et 3' du gène *Tat*, flanquées des sites de
10 restrictions *Nde* I ou *Hind* III. Le fragment d'amplification PCR a ensuite été cloné dans le vecteur d'expression procaryote pET3a (NOVAGEN) et la protéine Tat a été exprimée dans *E. coli* à partir du vecteur recombinant ainsi obtenu, selon les protocoles standards recommandés par le fournisseur. La protéine Tat recombinante a été purifiée par passage sur une colonne d'héparine puis par chromatographie à haute
15 pression en phase inverse, selon les protocoles standard de chromatographie.

Alternativement le gène *Tat* a été cloné dans le plasmide pTriEx-1 (NOVAGEN) qui permet l'expression de Tat dans *E. coli*, dans des cellules d'insectes ou des cellules de mammifères sous le contrôle, respectivement, du promoteur T7, du promoteur p10, et d'un promoteur hybride entre l'activateur du promoteur précoce du
20 cytomégalovirus et le promoteur de la β -actine de poulet.

Une stratégie similaire a été utilisée pour produire des mutants de Tat86 dans lesquels chacune des sept cystéines de la région riche en cystéine est substituée en sérine (Tat86Ser, contrôle) ou en un acide aminé hydrophobe, tel qu'une leucine (Tat86C(22-37)).

25 3) Préparation de Tat complexée à des sucres polysulfatés ou à des ions métalliques (Zn^{2+})

L'héparine (poids moléculaire 15000 ; H3393 (SIGMA)) et ses fragments de poids moléculaire 6000 (H5284, SIGMA) et 3000 (H3400, SIGMA) ont été mélangés avec Tat101 ou Tat86 en tampon PBS, dans un rapport molaire
30 Tat/héparine de 1/1, et les complexes ont été incubés à 20°C pendant un temps compris entre 1 heure et une nuit. Les complexes obtenus à partir de Tat101 sont dénommés Tat101/Hep3000, Tat101/Hep6000 et Tat101/Hep15000, et de même pour

Tat 86. Des complexes entre Tat101 ou Tat86 et d'autres sucres polysulfatés tels que le sulfate de dextran (Dextran ; D7037, SIGMA.) et le pentosane polysulfate (PPS ; SIGMA) ont été préparés comme indiqué ci-dessus pour les complexes entre Tat et l'héparine. Les complexes ainsi obtenus à partir de Tat101 sont dénommés
5 Tat101/Dextran et Tat101/PPS.

Une stratégie similaire a été utilisée pour préparer des complexes entre Tat101 ou Tat86 et des ions Zn^{2+} (Tat101/Zn ; Tat86/Zn).

Des complexes entre Tat101, Tat86 ou des dérivés inactivés de Tat tels que Tat101R(52,53)Q, et deux ligands différents de Tat comme des cations polyvalents, notamment divalents comme Zn^{2+} et un sucre polysulfaté tel que l'héparine ont également été préparés. De manière plus précise, les deux ligands sont mélangés avec Tat, en tampon PBS (rapport équimolaire Tat/héparine ; $ZnCl_2$ en excès d'un facteur 6, par rapport à Tat), puis le mélange est incubé une heure à température ambiante. Les complexes ainsi obtenus sont dénommés Tat101/Zn/Hep6000 et
10 Tat101R(52,53)Q/Zn/Hep6000.
15 Tat101R(52,53)Q/Zn/Hep6000.

4) Préparation d'oligomères de Tat

Des dimères covalents de Tat ont été préparés par oxydation des résidus de cystéine. De manière plus précise, un dérivé monomérique de Tat comme par exemple le dérivé Tat101C(22-31 ; 37)S, a été dissous en tampon phosphate de sodium 50 mM, pH 8 (concentration finale $10^{-4}M$). La solution a été incubée pendant
20 48 heures à température ambiante (environ 20 °C), sous agitation. Le milieu réactionnel a ensuite été acidifié jusqu'à pH 2 avec une solution contenant du TFA (TFA/H₂O, 1/1, v/v). Le dimère de Tat a enfin été purifié par chromatographie liquide haute performance en phase inverse à l'aide d'une colonne analytique C4 (15cmx4,6mm,
25 5μM, 300 Å, JUPITER). La nature dimérique du dérivé de Tat a été vérifiée par analyse en acides aminés et spectrométrie de masse.

Exemple 2 : Tat est structurellement flexible et particulièrement sensible à la dégradation protéolytique.

1) Matériels et méthodes

30 a) Préparation de Tat

Tat86 et Tat101 sont produites par synthèse chimique ou par les techniques d'ADN recombinant, comme décrit à l'exemple 1.

b) Analyse de la susceptibilité de Tat101 à la protéolyse

La protéine Tat101 a été dissoute extemporanément en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,0, à la concentration finale de 0,1g/L, puis incubée à 37°C avec l'enzyme (trypsine ou chymotrypsine, ROCHE DIAGNOSTICS GmBH), dans un rapport enzyme/substrat de 1/200 (P/P). A différents temps d'incubation (30 sec, 1 min, 2 min, 5 min, 6 min), 5µl de TFA 5% ont été ajoutés pour arrêter la digestion enzymatique, et les fragments peptidiques produits ont été identifiés par chromatographie liquide couplée en ligne à la spectrométrie de masse (ESI-MS, Quattro II, MICROMASS).

10 c) Analyse dichroïque des protéines Tat86 et Tat101

Les mesures en dichroïsme circulaire ont été effectuées à l'aide d'un dichrographe (CD6, YVON JOBIN), à température ambiante. Les solutions d'échantillons à 15 µM en tampon phosphate de potassium 5 mM pH 7,0 ont été préalablement filtrées sur membranes 0,45µm, avant transfert dans des cuves en quartz de 2 mm de trajet optique. Chaque spectre est le résultat de quatre mesures dans la région UV lointain (190 nm-250 nm), obtenues à une résolution de 0,2 nm, avec un temps d'intégration de 0,5 sec et une bande passante de 2 nm.

2) Résultats

Les études de dichroïsme circulaire montrent que les protéines Tat86 et Tat101 sont toutes deux dépourvues de structure secondaire (figure 1) et indiquent qu'elles adoptent une structure flexible, dépourvue de feuillet β et d'hélice α. La faible organisation structurale d'une protéine induit une flexibilité importante et par voie de conséquence une faible stabilité thermodynamique et une forte susceptibilité à la protéolyse. Ce qui est le cas de la protéine Tat, puisqu'elle est particulièrement sensible à la dégradation protéolytique. En effet, l'analyse effectuée avec la protéine Tat de 101 acides aminés montre qu'elle subit une première coupure après seulement 30 secondes d'incubation à 37°C avec la trypsine ou la chymotrypsine (figure 2).

Les inventeurs ont émis l'hypothèse que l'amélioration de la stabilité de Tat devrait diminuer sa susceptibilité protéolytique et augmenter sa demi-vie dans l'organisme, ainsi que son immunogénicité. Cette hypothèse a été validée en comparant l'immunogénicité de Tat non-modifiée à celle de molécules Tat préalablement

stabilisées. La stabilisation de Tat a été entreprise, soit par complexation avec un ligand, soit par incorporation de groupements hydrophobes.

Exemple 3 : Stabilisation de Tat par formation de complexes entre Tat101 et un ligand de Tat (héparine, Zn^{2+})

5 **1) Matériels et méthodes**

a) Production de complexes Tat/ligand

Les protéines Tat86 et Tat101, libres ou complexées à l'héparine ou bien à des ions Zn^{2+} sont produites comme décrit à l'exemple 1.

10 b) Analyse de la susceptibilité de Tat101 et de Tat101/héparine à la dégradation protéolytique

L'analyse est effectuée dans les conditions décrites à l'exemple 2, à l'exception de la durée d'incubation avec la trypsine qui est de 15 min et de la concentration en protéine Tat qui est de 0,5 g/L.

15 d) Analyse de la réponse anticorps induite par Tat et les complexes Tat/ligand, chez l'animal

L'analyse de la réponse anticorps induite par Tat et ses dérivés a été effectuée chez la souris BALB/c et la souris SWISS (non-consanguine). Les différents immunogènes ont été mélangés à volume égal avec de l'hydroxyde d'alumine puis injectés, par voie intrapéritonéale, à raison de 5 μ g de protéine Tat par souris
20 BALB/c, dans un volume final de 100 μ l. Les souris ont été immunisées deux fois à 14 jours d'intervalle. Un prélèvement sanguin a été effectué 14 et 28 jours après la seconde immunisation.

Alternativement, des souris SWISS ont été immunisées avec Tat et ses dérivés, en l'absence d'adjuvant, par voie sous-cutanée, à raison de 16 μ g de
25 protéine Tat par souris, dans un volume final de 100 μ l. Les souris ont été immunisées deux fois à 14 jours d'intervalle. Un prélèvement sanguin a été effectué 14 jours après la seconde immunisation.

Les sérums ont ensuite été testés pour la présence d'anticorps anti-Tat par un test immunoenzymatique (ELISA). Dans ces expériences, Tat a préalablement été adsorbé sur des plaques ELISA. Les plaques ELISA ont été saturées avec de
30 la sérum albumine bovine à 0,1%. Des dilutions de sérums ont enfin été incubées sur les plaques pendant une nuit à 4°C. La présence d'anticorps anti-Tat a été révélée à

l'aide d'un anticorps de chèvre spécifique des anticorps de souris couplé à la peroxydase et de l'ABTS comme substrat.

c) Profil antigénique des sérums produits par immunisation avec Tat101 et Tat101/Hep6000.

5 Ce profil a été établi à l'aide d'un test immunoenzymatique. 18 peptides chevauchants d'une longueur de 15 acides aminés, représentant la totalité de la séquence de Tat, ont été synthétisés en phase solide, comme décrit à l'exemple 1. Les peptides ont ensuite été adsorbés sur des puits de plaque ELISA (10µg/100µl/puits). Les plaques ELISA ont été saturées avec 0,1% de sérum albumine
10 bovine. Des dilutions des échantillons de sérums anti-Tat101 et Tat101 /héparine6000 à tester, ont ensuite été ajoutés dans les plaques et l'incubation a été poursuivie une nuit à 4°C. La présence d'anticorps anti-Tat a ensuite été révélée à l'aide d'un anticorps de chèvre spécifique des anticorps de souris couplé à la peroxydase et de l'ABTS comme substrat.

15 2) Résultats

a) La formation de complexes entre Tat et un ligand de Tat 101 permet d'accroître la stabilité de Tat101 vis-à-vis de la protéolyse.

Trois types de complexes Tat/héparine avec un rapport molaire Tat/ligand de 1/1, ont été préparés à partir de Tat101 et des héparines de masse moléculaire 15000, 6000 et 3000 qui présentent une affinité décroissante pour la protéine.
20 L'analyse comparative de la susceptibilité à la protéolyse, de la protéine Tat libre et de la protéine Tat complexée, montre que Tat libre est complètement dégradée en 15 minutes alors qu'elle est dégradée plus lentement lorsqu'elle est complexée (figure 3). Le fragment héparine 3000 de faible affinité protège assez peu Tat, alors que l'héparine 15000 et le fragment d'héparine 6000, plus affins, protègent mieux la protéine
25 (figure 3). Ainsi, la formation de complexes entre Tat et l'héparine ou des fragments d'héparine permet de stabiliser Tat vis-à-vis de la dégradation protéolytique. Dans une moindre mesure, la formation de complexes entre Tat et le Zn^{2+} permet également de stabiliser Tat vis-à-vis de la dégradation protéolytique (Tableau I : voir exemple 6,
30 Résultats).

b) La formation de complexes entre Tat et l'héparine permet d'augmenter la réponse humorale induite contre Tat.

La réponse en anticorps anti-Tat induite par immunisation de souris BalB/c avec, soit Tat101 mélangé à de l'hydroxyde d'alumine, soit des complexes
5 Tat101/Hep15000 ou Tat101/Hep6000, mélangés à de l'hydroxyde d'alumine, a été analysée par ELISA. Les résultats montrent que la réponse humorale est augmentée quand Tat101 est préalablement complexée à l'héparine 15000 ou 6000 (figure 4) ; les titres en anticorps induits par Tat101 sont dix fois inférieurs à ceux induits par Tat101/Hep15000 et Tat101/Hep6000.

10 Des expériences analogues, réalisées chez des souris SWISS et en l'absence d'adjuvant, montrent que les complexes Tat/héparine (Tat101/Hep6000 et Tat86/Hep6000) sont également capables d'induire une réponse immune chez une population non-consanguine, et ce en l'absence d'adjuvant (figure 13).

En outre, dans la mesure où l'interaction avec le ligand héparine
15 pourrait masquer certains sites antigéniques de Tat et en démasquer d'autres, et induire une réponse humorale contre des déterminants qui ne sont pas ceux naturellement présentés par la protéine Tat libre, la spécificité antigénique des anticorps produits contre Tat101 et Tat101/Hep6000 a été analysée en ELISA. Pour ce faire, les sérums des souris immunisés avec Tat101 et Tat101/Hep6000 ont été incubés en présence
20 d'une série de 18 peptides chevauchants d'une longueur de 15 acides aminés représentant l'intégralité de la séquence de Tat.

Les résultats présentés à la figure 5 montrent que la spécificité antigénique des anticorps anti-Tat produits par immunisation avec Tat101/Hep6000 est similaire à celle produite par immunisation avec Tat101 libre.

25 En effet, l'immunisation avec Tat101 induit de façon prédominante, des anticorps dirigés contre la région 1-15 (titre > 1/3000), et plus faiblement contre les régions 71-90 et 86-101 (titres < 1/400). Les sérums issus de l'immunisation avec Tat101/héparine présentent le même profil antigénique. De plus, dans les deux cas, la région immunodominante est localisée dans la région N-terminale. La complexation
30 de Tat à l'héparine 6000 permet d'accroître l'intensité de la réponse humorale sans modifier la spécificité antigénique des anticorps anti-Tat produits.

Exemple 4 : Stabilisation de Tat par incorporation de groupements hydrophobes**1) Matériels et méthodes****a) Production de Tat et de ses dérivés**

Tat et ses dérivés dans lesquels les résidus de cystéine sont bloqués à l'aide de groupements hydrophobes du type S-tertio-butyle (StBu), sont synthétisés en phase solide, comme décrit à l'exemple 1.

b) Analyse de la susceptibilité de Tat86 et Tat86C(22-37)StBu à la dégradation protéolytique

Les protéines Tat86 et Tat86C(22-37)StBu ont été dissoutes extemporanément en tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,0, à la concentration finale de 0,5 g/L en protéine Tat, puis incubées à 37°C avec la pronase E (ROCHE DIAGNOSTICS GmbH), dans un rapport enzyme/substrat de 1/20 (P/P) Après 15 min d'incubation, 5µl de TFA 5 % ont été ajoutés pour arrêter la digestion enzymatique, et les fragments peptidiques produits ont été identifiés par chromatographie liquide couplée en ligne à la spectrométrie de masse (ESI-MS, Quattro II, MICROMASS).

c) Analyse de la réponse anticorps induite par Tat86 et Tat86C(22-37)StBu, chez l'animal

Cette analyse a été effectuée comme décrit à l'exemple 3 pour les complexes Tat/héparine, à l'exception que les sérums ont été prélevés, soit 14 et 28 jours (figure 9), soit 25, 35 et 47 jours (figure 8) après la dernière immunisation.

d) Analyse de la réponse cellulaire induite par Tat et ses dérivés

Les différents immunogènes ont été préparés et injectés selon le même protocole que celui décrit pour l'induction de la réponse humorale (exemple 3). Dix jours après la seconde immunisation, les rates des animaux ont été prélevées et dilacérées. Les splénocytes de souris ont ensuite été incubés en présence de séries de dilution de Tat86. Après 3 jours de stimulation à 37°C, de la thymidine tritiée a été ajoutée, et 18 heures plus tard, les cellules ont été prélevées et la prolifération cellulaire a été évaluée par mesure de la radioactivité incorporée, selon les protocoles standards.

e) Analyse de la liaison à l'héparine de Tat et de ses dérivés hydrophobes

Les antigènes Tat86, Tat86C(22-37)L et Tat86C(22-37)StBu ont été adsorbés dans les puits d'une plaque ELISA (0,1 µg/puits). Les plaques ont ensuite été saturées avec du tampon phosphate 0,1 M pH 7, contenant 0,3 % de sérum albumine bovine. Des séries de dilutions d'un conjugué héparine-albumine-biotine, ont ensuite été ajoutées dans les puits. Après une incubation d'une nuit à 4°C, la quantité du conjugué-héparine albumine-biotine liée à Tat 86 ou à ses dérivés a été révélée à l'aide de streptavidine couplée à la peroxydase puis d'ABTS comme substrat.

2) Résultats

10 a) Le blocage des cystéines de Tat par des groupements StBu permet d'accroître la stabilité d'une grande partie de la séquence de Tat.

Dans une seconde approche, la protéine Tat a été stabilisée par incorporation de groupements hydrophobes, dans le but de créer un coeur stabilisant. Les 7 cystéines localisées entre le résidu en position 22 et le résidu en position 37 de la région riche en cystéines de Tat ont été modifiées à l'aide de groupements hydrophobes du type S-tertio-butyle (StBu). Pour évaluer les effets de ce type de modification sur la stabilité de Tat, une protéine Tat86 dont les 7 cystéines sont bloquées par des groupements StBu (Tat86C(22-37)StBu) et une autre dont les cystéines sont libres (Tat86) ont été synthétisées. De la même manière, une protéine Tat101 avec les cystéines libres (Tat101) et une protéine Tat101 avec les cystéines bloquées par des StBu (Tat101C(22-37)StBu) ont également été synthétisées. L'analyse comparative de la stabilité de ces quatre protéines vis-à-vis de l'action protéolytique de la pronase montre des différences importantes entre les fragments issus de la protéolyse de chacune des quatre protéines (figures 6 et 7). Ainsi, les fragments issus de Tat101 et Tat86 sont pour la plupart de petite taille alors que ceux issus de Tat101C(22-37)StBu et Tat86C(22-37)StBu sont majoritairement de grande taille. Ces résultats indiquent que les protéines Tat dont les cystéines sont libres sont protéolysées de façon extensive, alors que celles dont les cystéines sont bloquées par des groupements hydrophobes sont partiellement protégées de l'action enzymatique. La présence, dans le produit de digestion de Tat101C(22-37)StBu et Tat86C(22-37)StBu de nombreux longs fragments dans la région s'étendant de l'acide aminé 13 à l'acide aminé 52 et de plusieurs longs fragments dans la région C terminale indique que la protection vis-à-

vis de l'action enzymatique s'exerce dans la région d'insertion des groupements hydrophobes mais aussi à distance de celle-ci.

b) Le blocage des cystéines de Tat par des groupements hydrophobes du type StBu permet d'accroître la réponse humorale dirigée contre Tat.

5 Dans un premier temps, l'effet de l'incorporation de groupements StBu sur l'immunogénicité de la forme longue de Tat (Tat101) a été évalué. Les résultats montrent que Tat101 induit une réponse anticorps qui est 15 fois plus faible que celle induite par Tat101C(22-37)StBu (figure 8). L'analyse comparative de l'immunogénicité de la forme courte de Tat (Tat86), de Tat86C(22-37)StBu et d'un
10 toxoïde de Tat préparé par carboxamidation (Tatcam) montre que Tat86C(22-37)StBu induit une réponse anticorps qui est plus de 30 fois supérieure à celle procurée par Tat86 et dix fois plus importante que celle induite par le toxoïde Tatcam (figure 9). Ainsi, l'incorporation de groupements StBu permet d'accroître significativement l'immunogénicité de Tat101 et de Tat86.

15 Des expériences analogues, réalisées chez des souris SWISS et en l'absence d'adjuvant, montre que les dérivés TatStBu sont également capables d'induire une réponse immune chez une population non-consanguine, et ce en l'absence d'adjuvant (figure 13).

c) les groupements hydrophobes incorporés dans Tat sont responsables de l'augmentation de l'immunogénicité

20

Le rôle de groupements hydrophobes dans l'augmentation de l'immunogénicité de Tat a été démontré par l'étude de l'immunogénicité d'une molécule Tat86 dont les 7 cystéines sont substituées respectivement par des leucines (Tat86 C(22-37)L, des phénylalanines (Tat8C(22-37)F), ou des tryptophanes (Tat86
25 C(22-37)W), par comparaison à une molécule Tat dont les 7 cystéines sont remplacées par des sérines (Tat86C(22-37)S), (figure 10).

d) La combinaison de la complexation à l'héparine et la création d'une zone hydrophobe augmentent l'immunogénicité de Tat

Les résultats présentés aux exemples 3 et 4 démontrent que l'on peut
30 augmenter sensiblement l'immunogénicité de Tat, soit par création d'une zone hydrophobe dans la molécule, soit par formation de complexes. Ces deux approches ont été mises en place à partir de deux régions distinctes de Tat. En effet, la formation de

complexes avec l'héparine est médiée par la région basique de Tat, localisée du résidu 49 au résidu 57, alors que les 7 cystéines sont regroupées dans la zone 22-37 de la molécule.

En conséquence, des études ont été réalisées pour vérifier dans un premier temps que les molécules Tat de caractère hydrophobe pouvaient toujours interagir avec l'héparine, puis pour déterminer si les composés nouvellement formés présentaient des caractéristiques immunogéniques encore accrues.

L'étude de la liaison de Tat86, Tat86C(22-37)StBu et Tat86C(22-37)L à l'héparine à l'aide d'un test ELISA montre que les trois molécules présentent la même aptitude à lier l'héparine (figure 11).

Après immunisation de souris BALB/c avec Tat86C(22-37)StBu libre ou préalablement complexé à de l'héparine 6000, dans des conditions telles que décrites à l'exemple 3 pour les dérivés de Tat, la réponse anticorps a été analysée en ELISA.

Les titres en anticorps obtenus par immunisation avec le complexe Tat86C(22-37)StBu/Hep6000 sont cinq fois supérieurs à ceux induits par immunisation avec Tat86C(22-37)StBu (figure 12). Ces résultats indiquent que la complexation à l'héparine augmente aussi l'immunogénicité des dérivés de Tat et que la combinaison des deux modifications permet ainsi d'obtenir une augmentation de l'immunogénicité supérieure à celle obtenue avec chacune des modifications, seule.

Des expériences analogues, réalisées chez des souris SWISS et en l'absence d'adjuvant, montrent que la combinaison des deux modifications permet aussi d'obtenir une augmentation de l'immunogénicité supérieure à celle obtenue avec une seule de ces modifications, chez une population non-consanguine, et ce en l'absence d'adjuvant (figure 13).

e) Le dérivé Tat86C(22-37)StBu libre ou complexé à l'héparine induit des cellules T chez l'animal.

Alors que la réponse anticorps anti-Tat joue un rôle crucial dans la limitation de la progression de la maladie, la réponse cellulaire dirigée contre Tat a aussi une place importante dans la protection vis-à-vis de l'infection virale. C'est pourquoi, l'effet des dérivés hautement immunogènes de Tat sur la réponse cellulaire anti-Tat a été évalué. Les résultats illustrés par la figure 14 montrent que les spléno-

cytes de souris immunisées avec Tat86 ne prolifèrent pas *in vitro* en présence de Tat ce qui indique que l'immunisation avec la forme sauvage de Tat86 ne permet pas d'induire des cellules T spécifiques chez l'animal (figure 14A). En revanche, les splénocytes issus des immunisations avec Tat86C(22-37)StBu (figure 14B) et
5 Tat86C(22-37)StBu/Hep6000 (figure 14C) prolifèrent "*in vitro*" en présence de Tat86, ce qui indique que des cellules T sont bien activées par immunisation à l'aide de ces deux immunogènes.

Exemple 5 : Analyse des propriétés transactivatrices des dérivés de Tat

1) Matériels et méthodes

10 Un plasmide rapporteur, dénommé pLTR-G, comprenant le gène de la protéine fluorescente verte EGFP sous le contrôle transcriptionnel du LTR du VIH-1, a été construit et transfecté de façon stable dans des cellules Hela.

De manière plus précise, la séquence du LTR de l'isolat AVR-2 du VIH-1 (Jones et al., Curr. Opin. Cell. Biol., 1993, 5 : 461-468 et numéro d'accès
15 GenBank K02007) couvrant les positions -137 à +58, relativement au site d'initiation de la transcription a été synthétisée selon la méthode décrite dans Stemmer et al., Gene, 1995, 164 : 49-53. Le LTR synthétique ainsi obtenu a été digéré par *Hind*III et *Sac*II et cloné aux mêmes sites du plasmide pEGFP-1 (CLONTECH), en amont du gène EGFP dépourvu de promoteur, pour donner le plasmide pLTR-G.

20 Une lignée de cellules Hela transfectée de façon stable par le plasmide pLTR-G, et exprimant l'EGFP de façon activable en présence de Tat a été sélectionnée.

La lignée de cellules Hela transfectées par le plasmide rapporteur a été incubée en présence de Tat ou de dérivés de Tat préparés comme décrit à
25 l'exemple 1 et de chloroquine (100 μ M final) dans un milieu sans sérum. Après 3 heures d'incubation à 37 °C, du milieu DMEM contenant 10 % de sérum de veau foetal a été ajouté. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 45 heures à 37°C et la fluorescence cellulaire a été analysée en cytométrie de flux.

2) Résultats

30 La figure 15 montre que contrairement à Tat101 et Tat86 qui sont capables de transactiver le LTR du VIH, les dérivés de Tat possèdent une activité de transactivation réduite. A l'exception des dérivés Tat101C(22-37)StBu et Tat86 C(22-

37)tBu dont l'activité de transactivation est réduite seulement de 60% par rapport à celle de Tat101 ou Tat86, tous les autres dérivés ont un pouvoir transactivateur quasiment aboli (réduction de 95% à 99% par rapport à Tat101 ou Tat86).

Exemple 6 : Mesure de la résistance de Tat et de ses dérivés vis-à-vis de la dégradation protéolytique

La stabilité protéolytique de Tat et de ses dérivés a été étudiée par analyse de la persistance d'un épitope B (KGLGISYGRK) de la région du core, qui est reconnu par l'anticorps monoclonal dénommé anti-Tat17S, et est particulièrement sensible à la chymotrypsine, du fait qu'il contient trois résidus hydrophobes (L, I et Y). La région core a été sélectionnée pour les raisons suivantes : (i) elle n'est pas modifiée dans l'ensemble des dérivés de Tat étudiés, (ii) elle n'est pas impliquée dans la liaison avec les ligands du type héparine (exemple 3), et (iii) elle n'est pas modifiée dans les dérivés hydrophobes de Tat (exemple 4).

1) Matériels et méthodes

Tat et ses dérivés sont dissous dans un tampon phosphate 50 mM pH 7. 2,5 µg de Tat ou de l'un de ses dérivés sont incubés en présence de tampon phosphate seul ou de tampon phosphate contenant de la chymotrypsine dans un rapport enzyme/substrat de 1/50 (P/P). Après 2 heures à 37°C, la réaction est arrêtée par ajout de PMSF (5 mM final). 300 µl de tampon phosphate pH 7 sont ensuite ajoutés et des dilutions sériées du milieu réactionnel sont distribuées dans les puits d'une plaque ELISA. Après une nuit d'incubation à 4°C, les plaques sont saturées par ajout de 200 µl de tampon phosphate de sodium 100 mM, pH 7,2, contenant 0,3 % de sérum albumine bovine et 0,003 % de thymérosal. Après une heure d'incubation à 37°C, les plaques sont lavées en tampon phosphate de sodium 0,01M pH 7,2 contenant 0,05 % de tween 20. Un liquide d'ascite contenant l'anticorps monoclonal anti-Tat17S spécifique de la région core de Tat est incubé au 1/100 dans les puits des plaques ELISA. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, les plaques sont lavées dans le même tampon que précédemment et un anticorps polyclonal de chèvre anti-immunoglobuline de souris couplé à la peroxydase est ajouté (dilution 1/5000). Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, les plaques sont lavées dans le même tampon que précédemment et l'ABTS est ajouté dans les puits. Après 30

minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance à 414 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur automatique (Multiskan MCC340, TITERTEK).

La proportion de Tat ayant résisté à l'action de la chymotrypsine est établie comme étant le rapport entre la dilution de Tat en présence de chymotrypsine (Tat chymo) et la dilution de Tat en l'absence de chymotrypsine (Tat en tampon phosphate : Tat tp). Ce rapport est mesuré pour une densité optique égale à 1 après incubation des différents anticorps et du substrat. Ce rapport est mesuré pour l'ensemble des dérivés de Tat (Tat dérivé chymo/Tat dérivé tp). La stabilité du dérivé par rapport à Tat sauvage, est ensuite déterminée par la division du rapport obtenu pour chaque dérivé de Tat, par le rapport mesuré pour Tat sauvage, le tout multiplié par 100 ((Tat dérivé chymo/Tat dérivé tp)/ (Tat sauvage chymo/Tat sauvage tp) x 100). Un pourcentage supérieur à 120 % correspond à une augmentation de stabilité par rapport à Tat sauvage (valeur égale à 100 %).

2) Résultats

La sensibilité des dérivés de Tat à la dégradation protéolytique est présentée dans les Tableaux I et II ci-dessous :

Tableau I : Stabilité des dérivés de Tat vis-à-vis de la digestion par la chymotrypsine (essai n°1)

Dérivés de Tat	Stabilité par rapport à Tat101 ou Tat86
Tat86C(22-37)S	49 %
Tat86C(22-37)StBu	156 %
Tat86C(22-37)L	194 %
Tat86C(22-37)F	210 %
Tat86C(22-37)W	310 %
Tat86/Hep6000	430 %
Tat86/Zn	167 %
Tat101C(22-37)StBu	132 %
Tat101C(22,34,37)S,C(25,27,30,31)StBu	755 %
Tat101/Hep6000	833 %

Tableau II: Stabilité des dérivés de Tat vis-à-vis de la digestion par la chymotrypsine (essai n°2)

Dérivés de Tat	Stabilité par rapport à Tat101 ou Tat101R(52,53)Q
Tat101/Zn	216 %
Tat101/Zn/Hep6000	191 %
Tat101/PPS	1110 %
Tat101/Dextran	330 %
Tat101R(52,53)Q/Hep6000	390 %
Tat101R(52,53)Q/Zn/Hep6000	164 %

5 Les Tableau I et II indiquent que la complexation de Tat à un ligand comme un sucre polysulfaté (héparine, sulfate de dextran, pentosane polysulfate) ou un ion métallique, notamment un cation divalent comme Zn^{2+} , ou bien l'augmentation du caractère hydrophobe de Tat augmentent la stabilité de Tat comme le montre la

10 résistance accrue des dérivés de Tat selon l'invention, vis-à-vis de la dégradation protéolytique. Par comparaison le dérivé contrôle, Tat86Ser qui est substitué par des acides aminés polaires est moins stable que Tat86.

Exemple 7 : Analyse comparative de la réponse anticorps induite par Tat complexé à différents ligands.

1) Matériels et méthodes

15 a) Production de complexes Tat/ligand

La protéine Tat101 et le dérivé inactivé Tat101R(52,53)Q, libres ou complexés à l'héparine, au sulfate de dextran, au pentosane polysulfate ou bien à des ions Zn^{2+} sont produits comme décrit à l'exemple 1.

20 b) Analyse de la réponse anticorps induite par Tat et les complexes Tat/ligand, chez l'animal

L'analyse de la réponse anticorps induite par Tat101 et les complexes Tat101/Dextran et Tat101/PPS a été effectuée chez la souris BALB/c. Les différents immunogènes ont été mélangés à volume égal avec de l'hydroxyde d'alumine puis injectés, par voie intrapéritonéale, à raison de 5 µg de protéine Tat par

25 souris BALB/c, dans un volume final de 100 µl. Un prélèvement sanguin a été effectué 14 et 28 jours après l'immunisation.

Alternativement, des souris BALB/c ont été immunisées avec Tat101 ou le dérivé inactivé Tat101R(52,53)Q, libres ou complexés à Zn^{2+} et/ou à l'héparine, en l'absence d'adjuvant, par voie sous-cutanée, à raison de 5 μ g de protéine Tat par souris, dans un volume final de 100 μ l. Les souris ont été immunisées
5 deux fois à 14 jours d'intervalle. Un prélèvement sanguin a été effectué 14 jours après la seconde immunisation.

Les sérums ont ensuite été testés pour la présence d'anticorps anti-Tat par un test immunoenzymatique (ELISA) comme décrit à l'exemple 3.

2) Résultats

10 La réponse en anticorps anti-Tat induite par immunisation de souris BALB/c avec, soit Tat101 mélangé à de l'hydroxyde d'alumine, soit des complexes Tat101/Dextran ou Tat101/PPS, mélangés à de l'hydroxyde d'alumine, a été analysée par ELISA. Les résultats montrent que la réponse humorale est augmentée quand
15 Tat101 est préalablement complexée à un sucre polysulfaté (figure 16) ; les titres en anticorps induits par Tat101 sont dix fois inférieurs à ceux induits par Tat101/Dextran et Tat101/PPS. Les résultats sont comparables à ceux obtenus avec les complexes Tat/Hep6000 et Tat/Hep15000 (exemple 3 et figure 4).

La réponse en anticorps anti-Tat induite par immunisation de souris BALB/c avec Tat101 ou le dérivé inactivé Tat101R(52,53)Q, libres ou complexés à
20 Zn^{2+} et/ou à l'héparine, et en l'absence d'adjuvant, montrent que contrairement aux complexes Tat/héparine (Tat101/Hep6000), les complexes Tat/Zn ne sont pas capables d'induire une augmentation de la réponse immune, et ce en l'absence d'adjuvant (figure 17). En revanche, les complexes Tat/héparine/Zn se comportent comme les complexes Tat/héparine et sont capables d'induire une augmentation de la
25 réponse immune, et ce en l'absence d'adjuvant. Tat101 et le dérivé inactivé de Tat (Tat101R(52,53)Q) donnent des résultats comparables.

Exemple 8 : Analyse des formes de Tat stabilisées à l'aide de Zn^{2+}

1) Méthodes

a) analyse électrophorétique des formes de Tat

30 La protéine Tat101 (58 μ M finale), préparée comme décrit à l'exemple 1, a été incubée dans du tampon PBS (pH7,4), en présence de $ZnCl_2$ (en excès d'un

facteur 6 par rapport aux cystéines de Tat) ou en l'absence de ZnCl_2 , pendant différents temps, à température ambiante, sans agitation, dans le noir.

L'apparition des formes oligomériques de Tat a été analysée par électrophorèse sur un gel constitué d'un polymère non-réticulé formant des pores dynamiques et analyse sur un bioanalyseur (Agilent 2100, AGILENT TECHNOLOGIES), à l'aide du kit Protein 50 Plus LabChip (AGILENT TECHNOLOGIES). Les puces ont été préparées selon le protocole fourni par le fabricant ; les canaux de la puce ont été remplis avec le mélange de gel et de marqueur fluorescent utilisé pour la détection des protéines.

Les échantillons de Tat101 incubée dans du PBS, en présence ou en l'absence de ZnCl_2 , ont été préincubés avec du maléimide (20 mM), de façon à bloquer les cystéines réactives et éviter la formation de ponts disulfure lors de la dénaturation ou de la migration des échantillons dans le gel.

Ensuite, les échantillons de Tat ont été dénaturés en présence de SDS, à 95°C, pendant 7 minutes avant leur chargement sur la puce. La puce a ensuite été chargée sur le bioanalyseur et chaque échantillon a été séparé dans le canal de séparation et détecté par mesure de la fluorescence (670 nm-700 nm) en 45 secondes.

b) analyse du pouvoir de transactivation des formes de Tat

Le protocole expérimental est celui décrit à l'exemple 5.

2) **Résultats**

a) analyse électrophorétique des formes de Tat stabilisées à l'aide de Zn^{2+}

L'analyse électrophorétique de Tat (figure 18) montre que Tat est une molécule instable qui évolue au cours du temps pour former des dimères ou des trimères. Après 5 jours d'incubation (ligne 4), on trouve majoritairement deux bandes correspondant à des formes oligomériques. La première est majoritaire et correspond à des formes dimériques, alors que la seconde correspond à des formes trimériques. La forme monomérique qui est observable aux lignes 1, 2 et 3 a, quant à elle, quasiment disparu. En revanche, en présence de ZnCl_2 , on ne trouve qu'une bande correspondant à la forme monomérique de Tat (ligne 6). Le zinc qui peut conduire à la formation d'homo ou d'hétérodimères non-covalents, stabilise donc Tat en bloquant la formation de ponts disulfure intermoléculaire, médiée par les cystéines.

b) analyse du pouvoir de transactivation des formes de Tat stabilisées à l'aide de Zn^{2+}

Le pouvoir transactivateur de Tat en présence ou en l'absence de $ZnCl_2$, a été analysé afin d'évaluer si la stabilisation par le zinc altère l'activité biologique de Tat. La figure 19 montre que les cellules transfectées par le plasmide rapporteur émettent de la fluorescence pour des concentrations de Tat ou de Tat
5 préalablement diluée avec $ZnCl_2$ qui sont similaires, ce qui indique que le Zinc stabilise Tat sans perturber son activité biologique principale.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui
10 viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Composition vaccinale anti-VIH, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un antigène Tat stabilisé, résistant à la dégradation protéolytique, lequel antigène stabilisé étant sélectionné dans le groupe constitué par :

5 a) un complexe entre une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, et un ligand non-métallique de Tat,

 b) une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou la modification par un groupement hydrophobe d'au moins un acide aminé de la
10 séquence de Tat, à l'exclusion des substitutions R52L, R55L, R57L, R78A, G79A, E80A et K89L, et

 c) un complexe entre la protéine Tat ou le fragment de Tat modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou la modification par un groupement hydrophobe, d'au moins un acide aminé de la séquence de Tat définis en b), et
15 un ligand non-métallique de Tat.

2°) Composition vaccinale selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit ligand non-métallique en a) ou en c), est de nature protéique, lipidique, glucidique, nucléotidique ou mixte.

3°) Composition vaccinale selon la revendication 2, caractérisée en
20 ce que ledit ligand non-métallique en a) ou en c) est un sucre polysulfaté choisi parmi : le sulfate de dextran, le pentosane polysulfate et les glycosaminoglycans polysulfatés tels que l'héparine et l'héparane sulfate.

4°) Composition vaccinale selon la revendication 3, caractérisée en ce que ladite héparine est une héparine de poids moléculaire de 15 000 Da ou un
25 fragment d'héparine de poids moléculaire de 6000 Da.

5°) Composition vaccinale selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit ligand non-métallique en a) ou en c) est la protéine Vpr du VIH.

6°) Composition vaccinale selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat en b), sont modifiés par substitution
30 par un acide aminé hydrophobe et/ou la modification par un groupement hydrophobe de 1 à 7 cystéines, situées en positions 22, 25, 27, 30, 31, 34 et/ou 37.

7°) Composition vaccinale selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'au moins les quatre cystéines en positions 25, 27, 30 et 31 sont substituées par un acide aminé hydrophobe et/ou modifiées par un groupement hydrophobe.

5 8°) Composition vaccinale selon la revendication 6 ou la revendication 7, caractérisée en ce que ledit acide aminé hydrophobe est sélectionné dans le groupe constitué par : une leucine, un tryptophane et une phénylalanine et/ou ledit groupement hydrophobe est le S-tertio-butyle.

9°) Composition vaccinale selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que ledit antigène Tat stabilisé dérive d'une protéine Tat
10 ou d'un fragment de Tat inactivés.

10°) Composition vaccinale selon la revendication 9, caractérisée en ce que ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat inactivés comprennent la substitution de chacune des cystéines en positions 22, 34 et 37 en sérines ou bien la substitution de chacune des arginines en positions 52 et 53 en glutamines.

15 11°) Composition vaccinale selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que ladite protéine Tat ou le fragment de ladite protéine sont choisis parmi : la protéine Tat de 101 acides aminés, la protéine Tat de 86 acides aminés, le fragment 1 à 57 de Tat et les fragments d'au moins 11 acides aminés inclus dans les protéines ou le fragment précédents.

20 12°) Composition vaccinale selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que ledit antigène Tat stabilisé dérive de la protéine Tat de séquence SEQ ID NO : 1 ou d'un fragment d'au moins 11 acides aminés de cette séquence.

25 13°) Composition vaccinale selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat en a) est également complexé à un ion métallique choisi parmi les cations polyvalents, de préférence divalents, tels que Zn^{2+} ou Cd^{2+} .

30 14°) Composition vaccinale selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat modifiés en b) ou en c) sont en outre complexés à un ion métallique choisi parmi les cations polyvalents, de préférence divalents, tels que Zn^{2+} ou Cd^{2+} .

15°) Composition vaccinale selon l'une quelconque des revendica-

tions 1 à 14, caractérisée en ce que ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat sont des monomères.

16°) Composition vaccinale selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisée en ce que ladite protéine Tat ou ledit fragment de Tat sont
5 des oligomères, de préférence des dimères.

17°) Composition vaccinale selon la revendication 16, caractérisée en ce que lesdits oligomères, de préférence dimères, sont formés de l'association covalente de ladite protéine Tat et/ou du fragment de ladite protéine par l'intermédiaire d'une liaison disulfure intermoléculaire impliquant l'une des cystéines
10 en position 22, 25, 27, 30, 31, 34 ou 37.

18°) Composition vaccinale selon la revendication 17, caractérisée en ce que ladite liaison disulfure implique l'une des cystéines en position 22, 34 ou 37.

19°) Composition vaccinale selon la revendication 18, caractérisée en ce que le dimère de Tat est formé de l'association par un pont disulfure entre les
15 cystéines en position 34, de deux protéines Tat ou de deux fragments de Tat d'au moins 11 acides aminés comprenant une sérine en positions 22 et 37 et une leucine en positions 25, 27, 30 et 31.

20°) Composition vaccinale selon la revendication 16, caractérisée en ce que lesdits oligomères, de préférence dimères, sont formés de l'association non-
20 covalente de ladite protéine Tat et/ou du fragment de ladite protéine par l'intermédiaire d'ions métalliques, de préférence de cations polyvalents, notamment divalents tels que Zn^{2+} et Cd^{2+} .

21°) Composition vaccinale selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisée en ce que ladite protéine Tat et/ou le fragment de ladite
25 protéine, éventuellement modifiés, sont sous la forme d'un polynucléotide ou d'un vecteur recombinant codant pour ladite protéine et/ou le dit fragment.

22°) Composition vaccinale selon l'une quelconque des revendications 1 à 20, caractérisée en ce qu'elle comprend un véhicule pharmaceutiquement acceptable, et/ou un adjuvant, et/ou une substance porteuse.

30 23°) Composition vaccinale selon la revendication 22, caractérisée en ce qu'elle est constituée par un antigène stabilisé selon l'une quelconque des reven-

dications 1 à 20 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable et/ou une substance porteuse.

24°) Composition vaccinale selon la revendication 22, caractérisée en ce que ledit adjuvant est l'hydroxyde d'alumine.

5 25°) Antigène Tat stabilisé selon l'une quelconque des revendications 1 à 21 comme vaccin pour la prévention et/ou le traitement d'une infection par le VIH chez l'Homme.

 26°) Utilisation d'un antigène Tat stabilisé selon l'une quelconque des revendications 1 à 21, pour la préparation d'un vaccin destiné à la prévention et/ou
10 au traitement d'une infection par le VIH chez l'Homme.

 27°) Complexe peptidique, caractérisé en ce qu'il est constitué par :

 - une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou la modification par un groupement hydrophobe d'au moins un acide aminé de la séquence de
15 Tat, tels que définis à l'une quelconque des revendications 1, 6 à 12 et 15 à 19, associés à

 - un ligand métallique de Tat, tel que défini à la revendication 14 et/ou un ligand non-métallique de Tat tel que défini à l'une quelconque des revendications 2 à 5.

20 28°) Protéine ou fragment peptidique, caractérisés en ce qu'ils sont choisis parmi une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe et/ou la modification par un groupement hydrophobe d'au moins un acide aminé de la séquence de Tat, tels que définis à l'une quelconque des revendications 1, 6 à 12 et 15 à 19, à l'exclusion
25 des substitutions R52L, R55L, R57L, R78A, G79A, E80A et K89L.

 29°) Procédé de préparation d'un antigène Tat stabilisé, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

 - la préparation, par tout moyen approprié, d'une protéine Tat de VIH ou d'un fragment de Tat tels que définis à l'une quelconque des revendications 1,
30 9 à 18 et 21, et de façon simultanée ou séquentielle,

 - la formation d'un complexe avec un ligand non-métallique de Tat tel que défini à l'une quelconque des revendications 2 à 5 et/ou la substitution par un

acide aminé hydrophobe et/ou la modification par un groupement hydrophobe, d'au moins un des résidus d'acides aminés de la séquence de Tat, telle que définie à l'une quelconque des revendications 1, 6, 7 et 8.

30°) Polynucléotide ou mélange de polynucléotides sélectionné dans
5 le groupe constitué par :

a) un polynucléotide ou un mélange de polynucléotides comprenant la séquence codant pour une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés tels que définis à l'une quelconque des revendications 1, 6 à 13 et 15 à 19, et la séquence codant pour un ligand peptidique de Tat, et

10 b) un polynucléotide comprenant la séquence codant pour une protéine Tat de VIH ou un fragment de Tat d'au moins 11 acides aminés, modifiés par substitution par un acide aminé hydrophobe d'au moins un acide aminé de la séquence de Tat tels que définis à l'une quelconque des revendications 1, 6 à 12 et 15 à 19, à l'exclusion des substitutions R52L, R55L, R57L, R78A, G79A, E80A et K89L.

15 31°) Vecteur recombinant comprenant le polynucléotide tel que défini en a) ou en b) de la revendication 30.

32°) Mélange de vecteurs recombinants comprenant chacun des polynucléotides du mélange tel que défini en a) de la revendication 30.

20 33°) Cellule eucaryotes modifiées par un polynucléotide, un vecteur recombinant ou un mélange tels que définis à l'une quelconque des revendications 30 à 32.

34°) Utilisation d'un ion métallique tel que défini à la revendication 13 ou 14, pour stabiliser la protéine Tat de VIH ou un fragment d'au moins 11 acides aminés de ladite protéine.

1/19

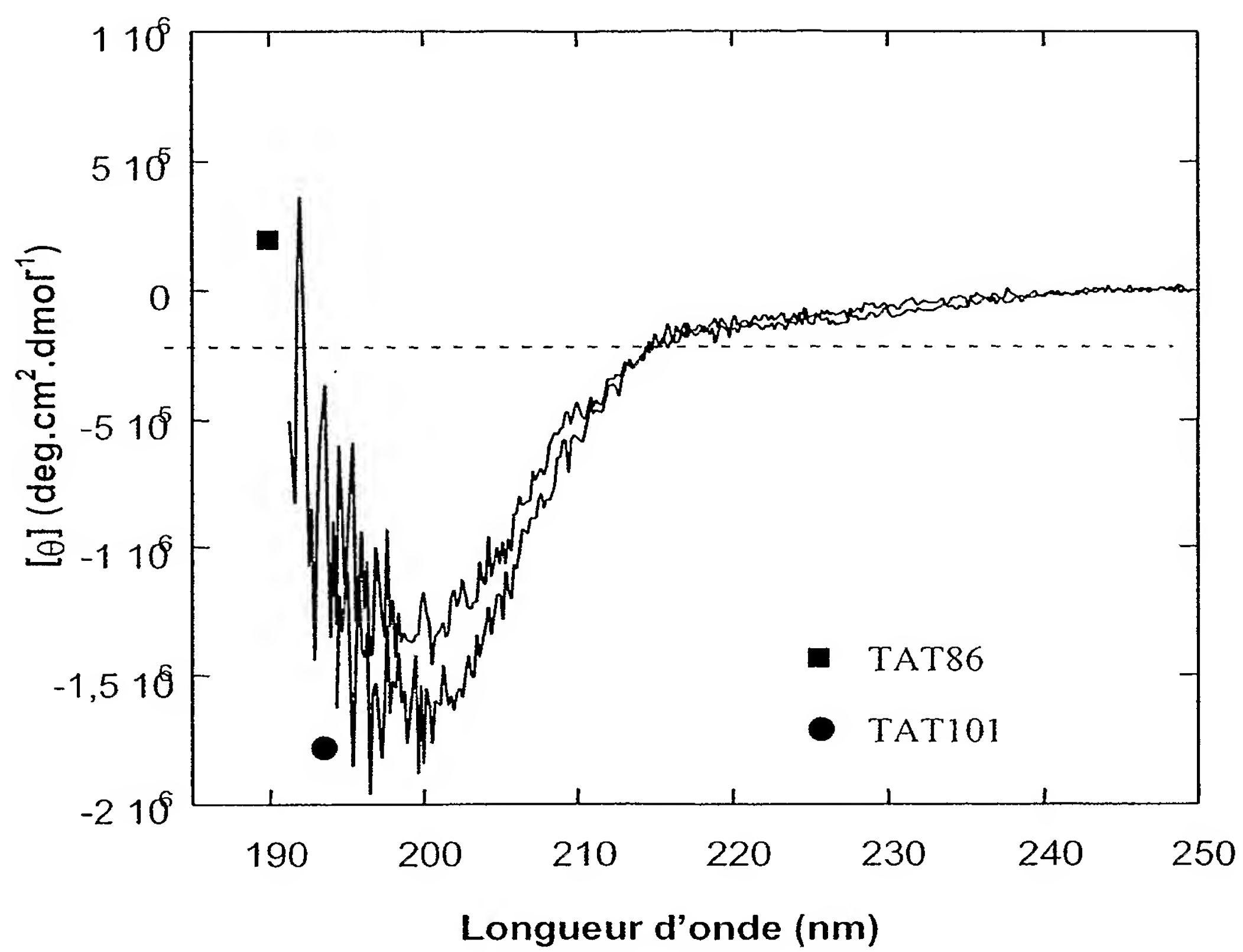
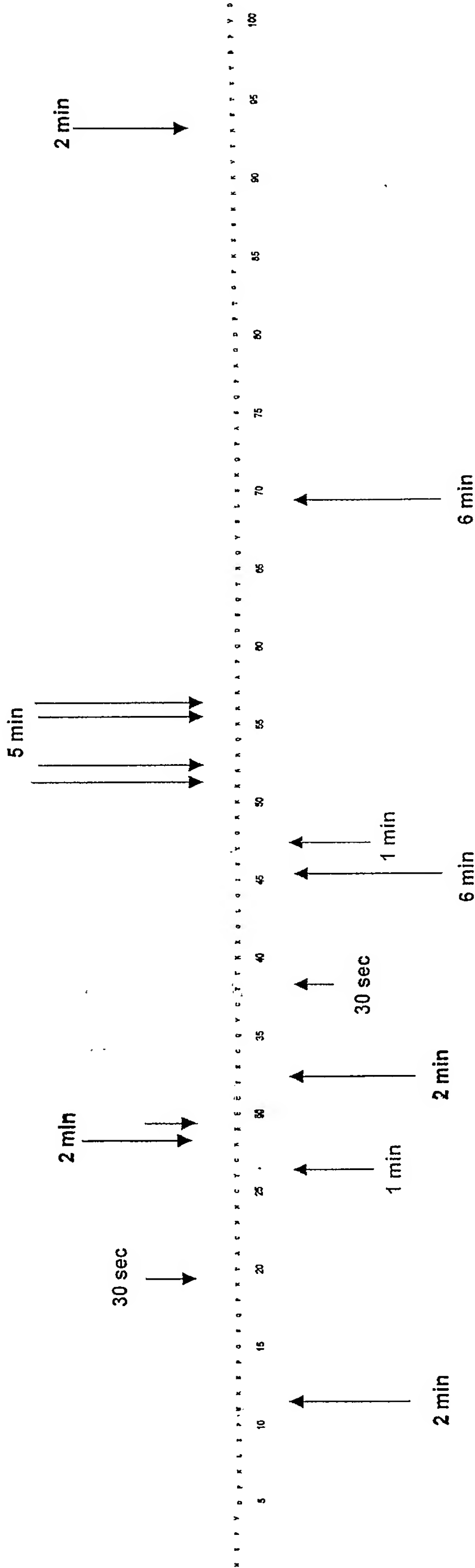


Figure 1

Cinétique de protéolyse de TAT-101SH par la Trypsine en tampon phosphate 50 mM pH7.
[E/S]:[1/200]:[w/w] avec [S]=10µg/100µl - 37°C



Cinétique de protéolyse de TAT-101SH par la Chymotrypsine en tampon phosphate 50 mM pH7.
[E/S]:[1/200]:[w/w] avec [S]=10µg/100µl - 37°C

Figure 2

3/19

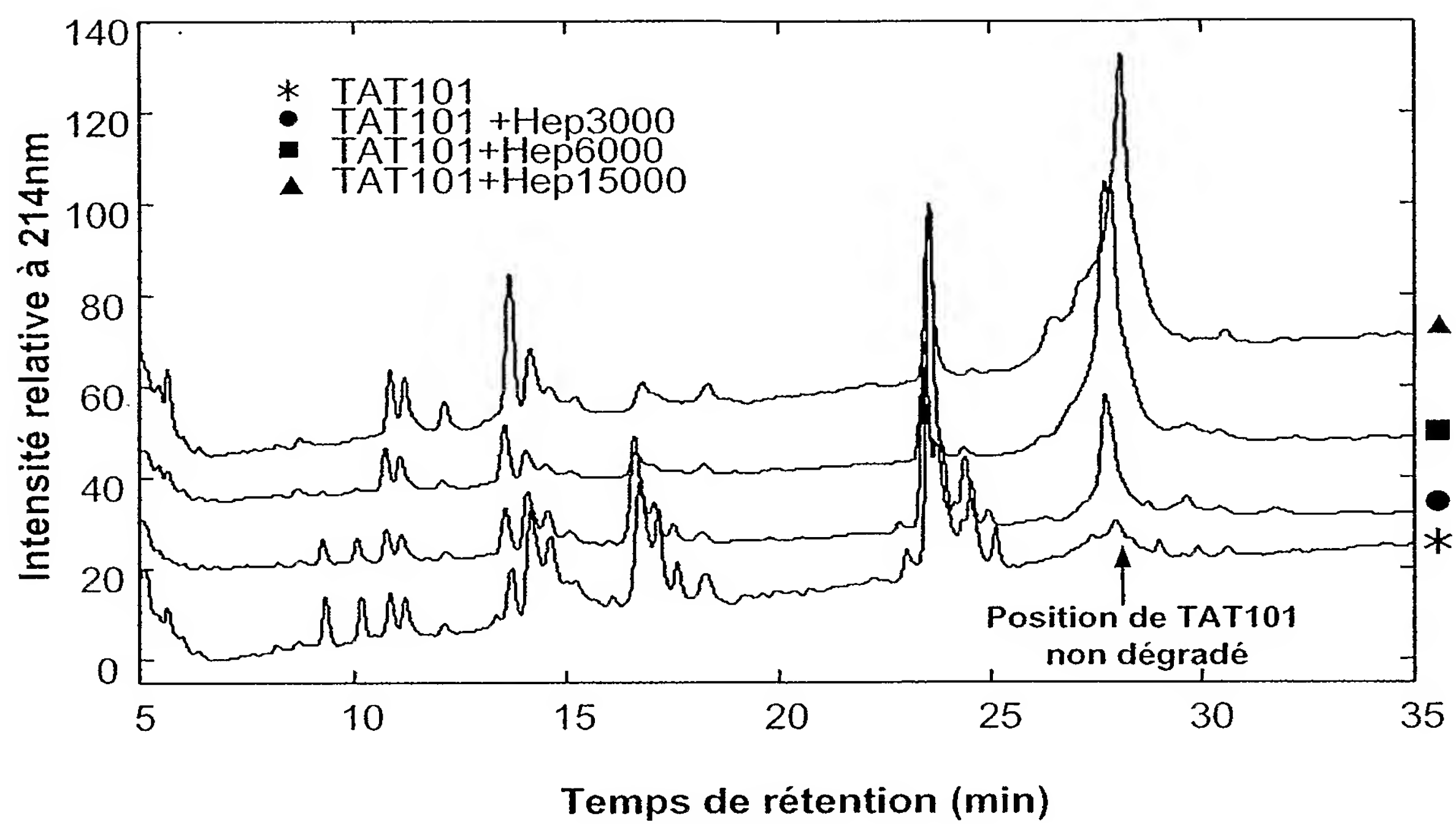


Figure 3

4/19

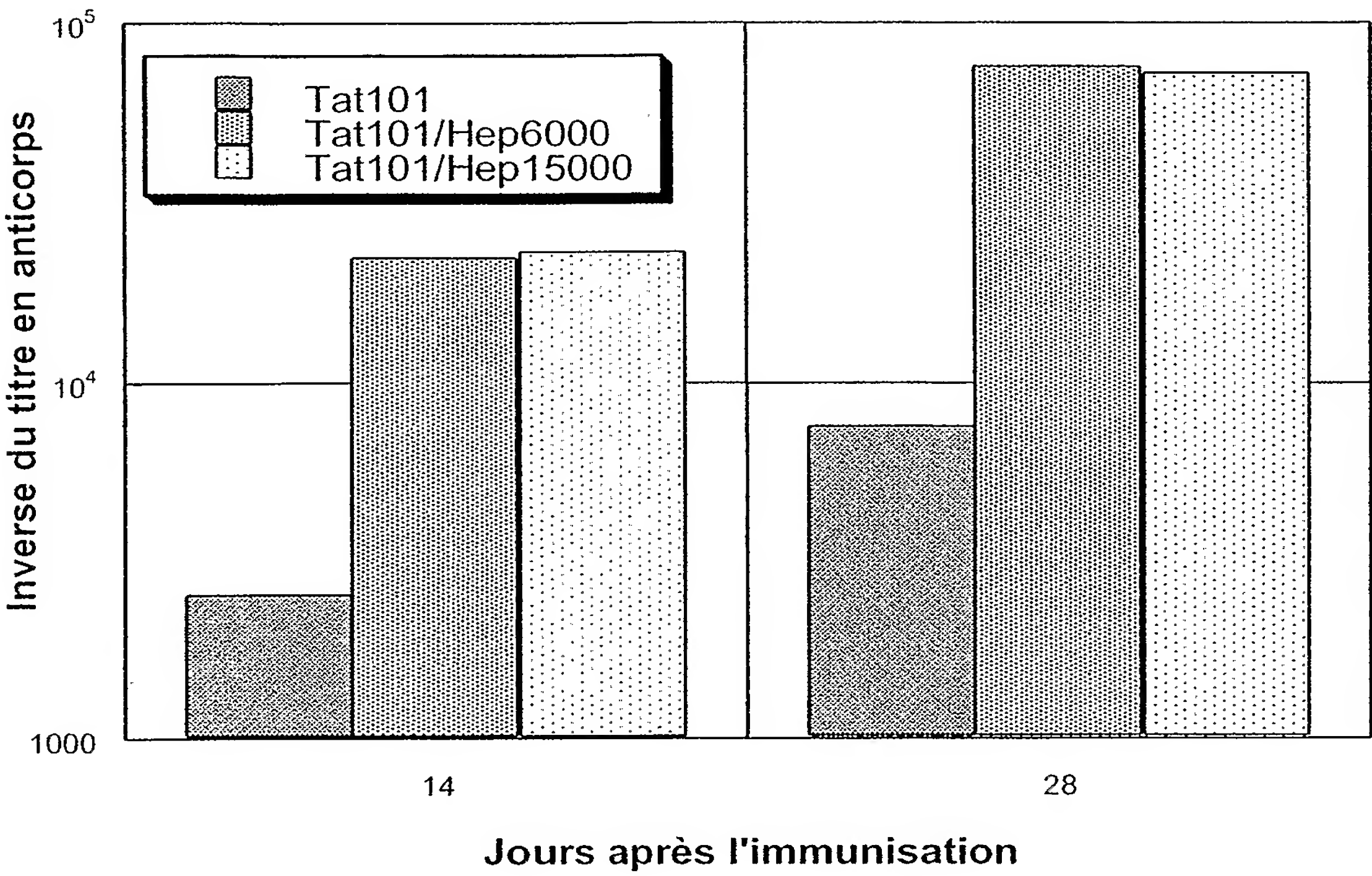


Figure 4

5/19

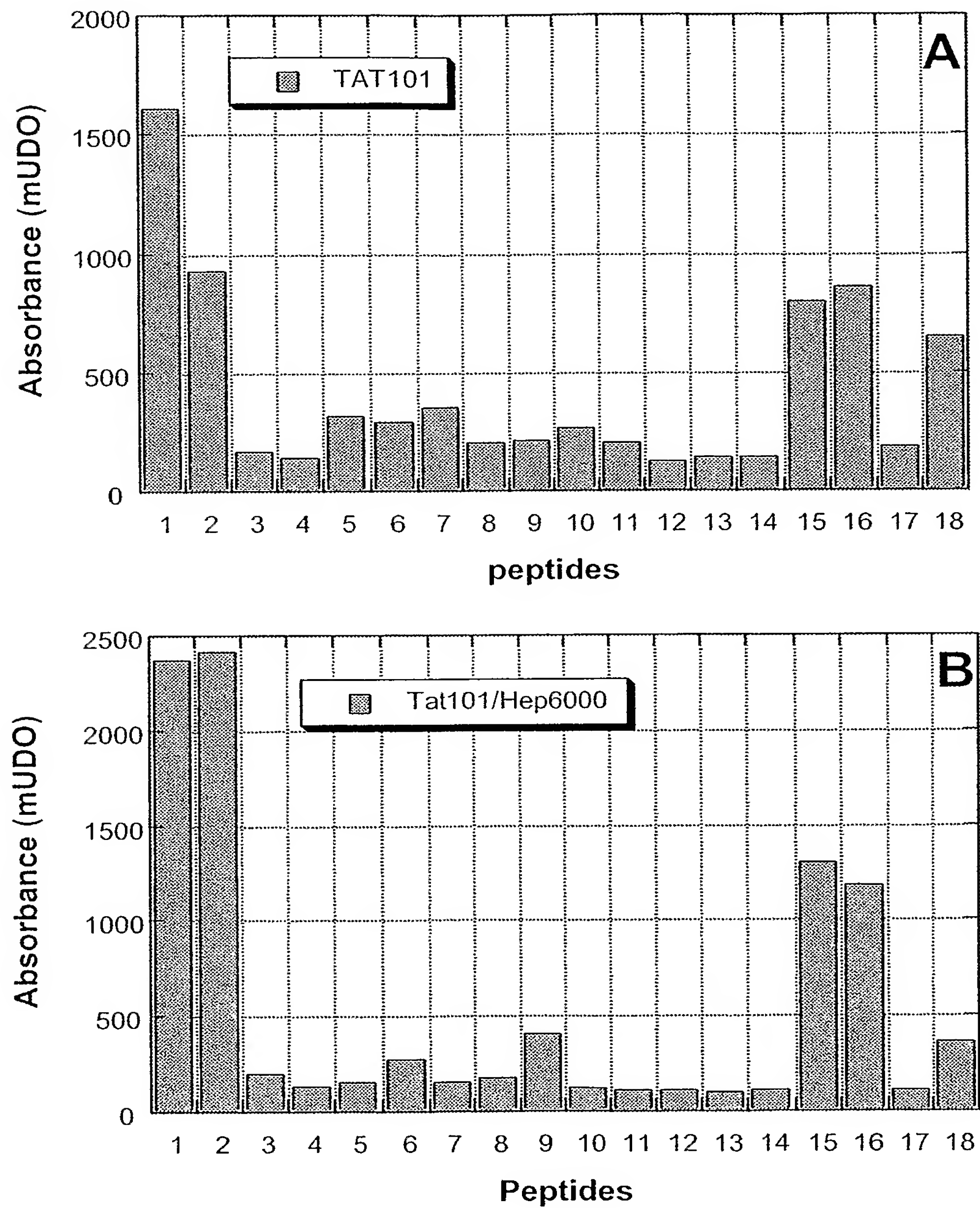


Figure 5

Cartographie peptidique de TAT86 par la Pronase E en tampon phosphate 50 mM pH7.
[E/S]:[1/20]:[m/m] avec [S]=10µg/20µl - 37°C - 15min

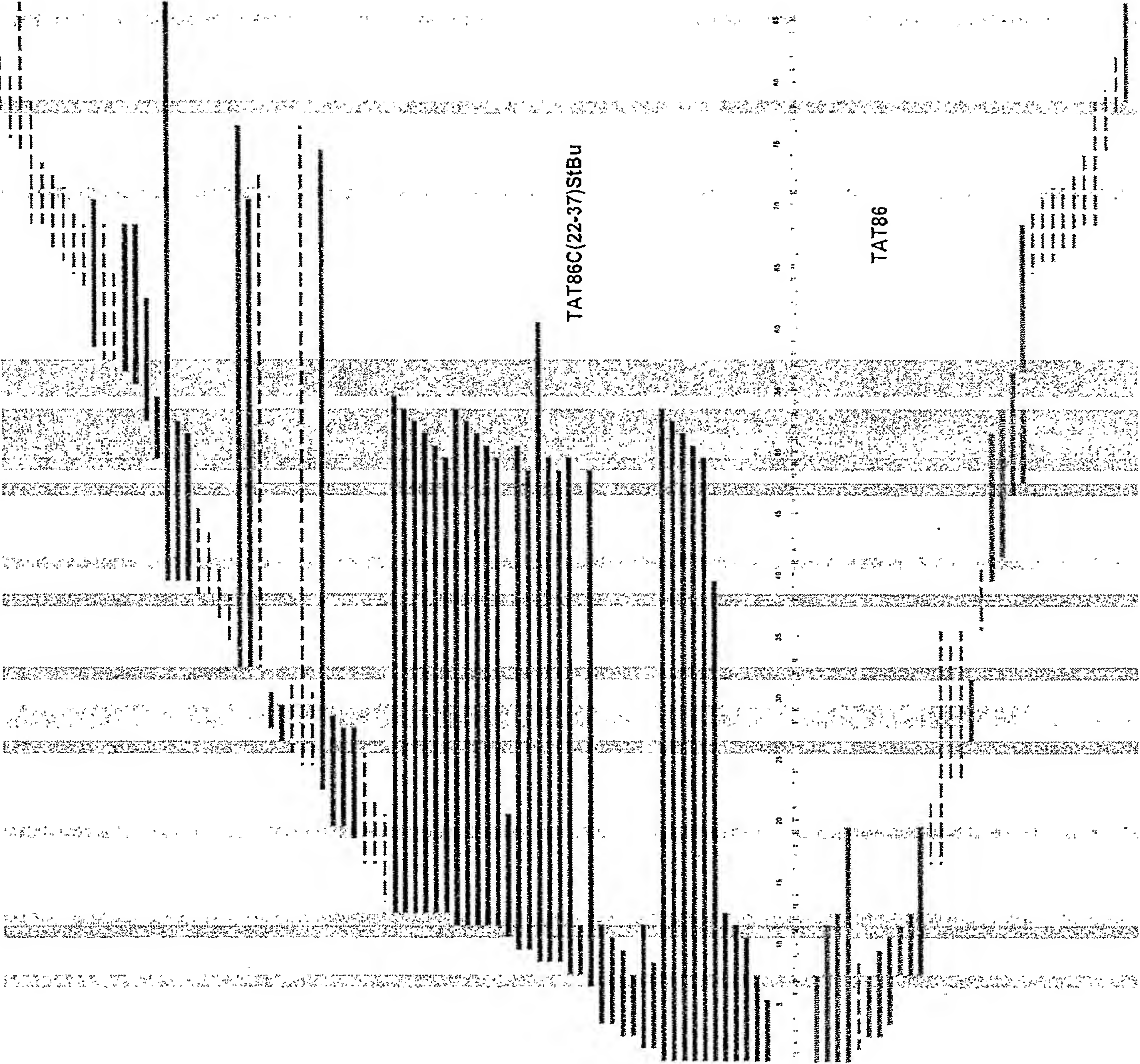


Figure 6

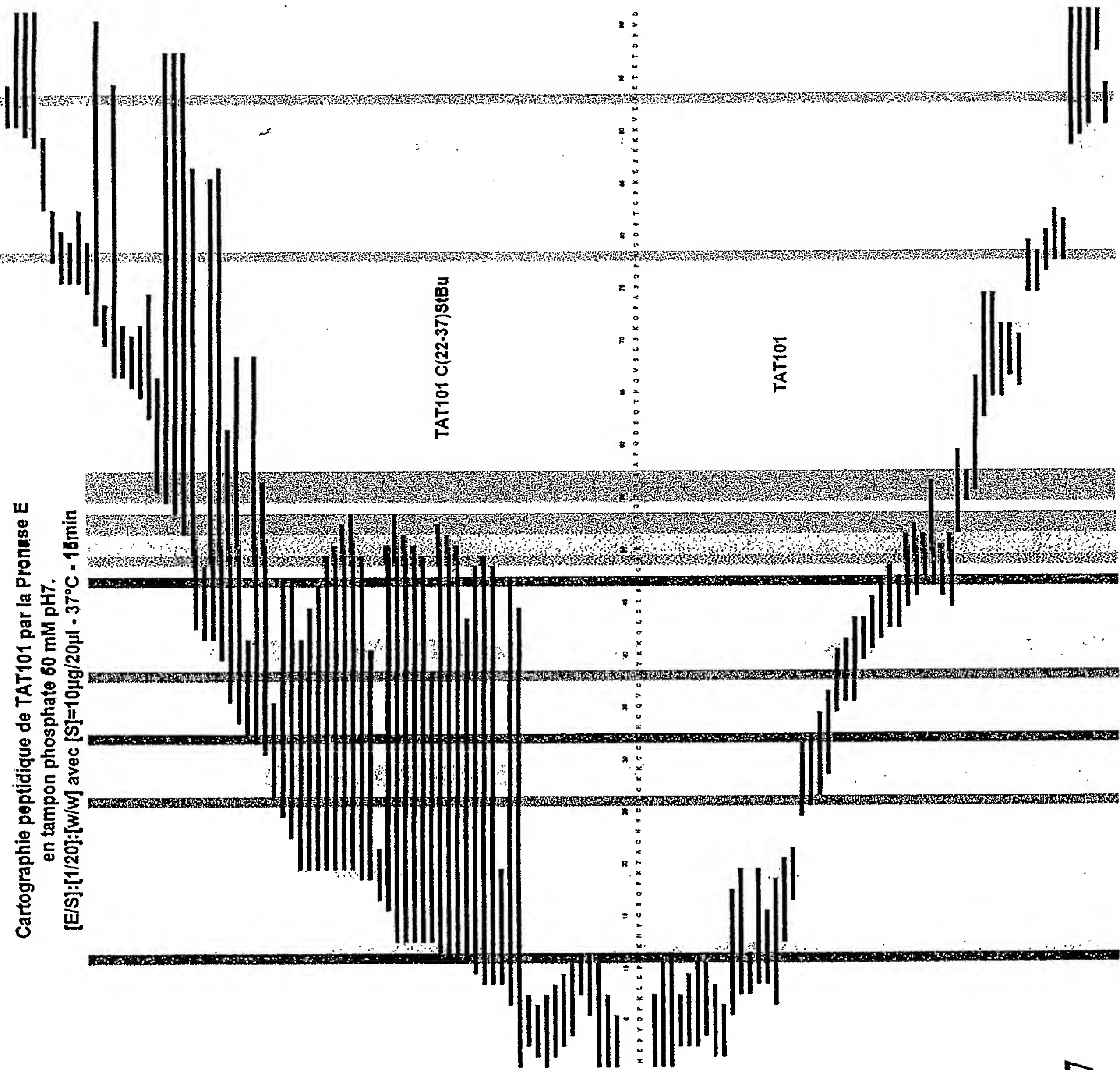


Figure 7

8/19

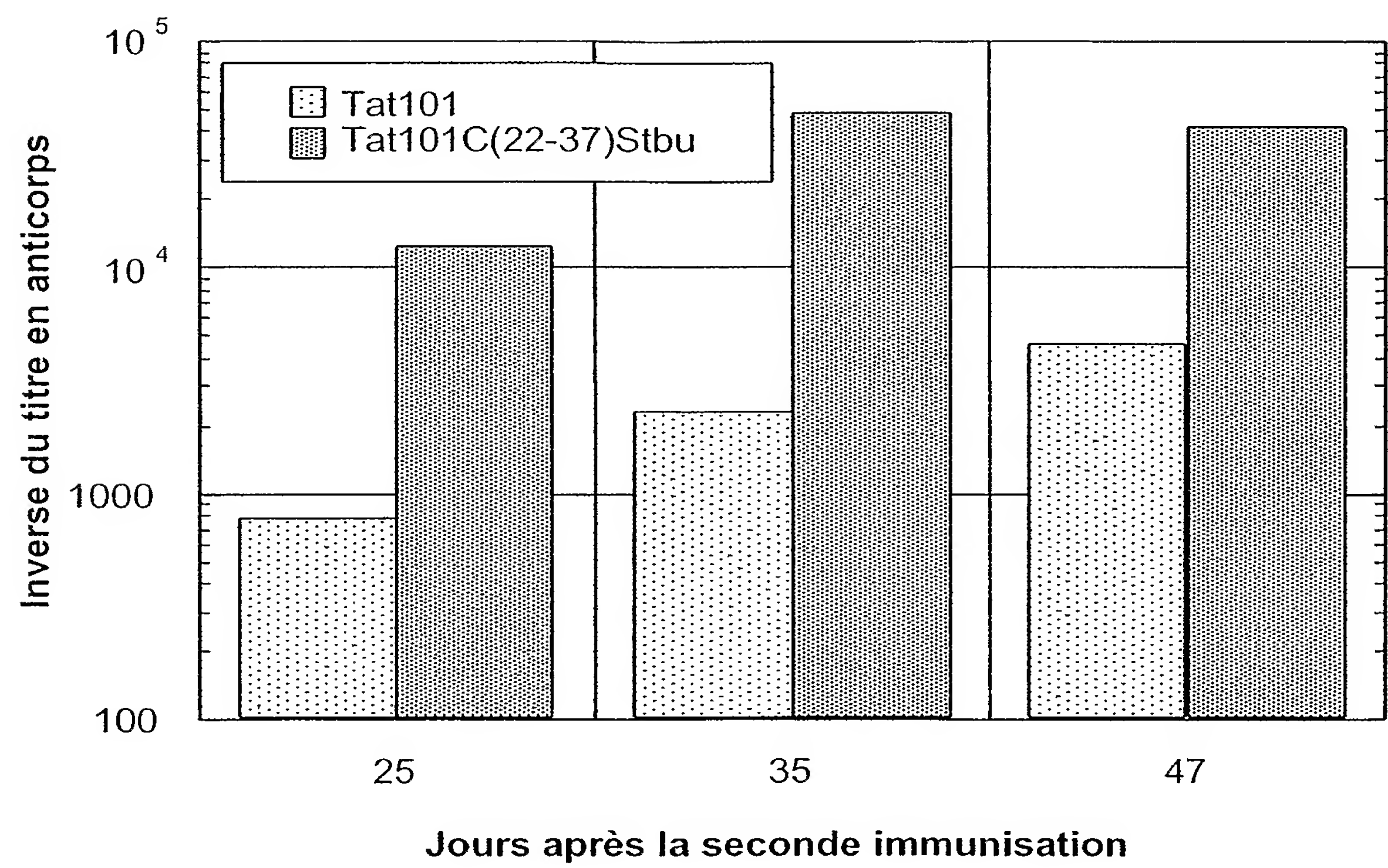


Figure 8

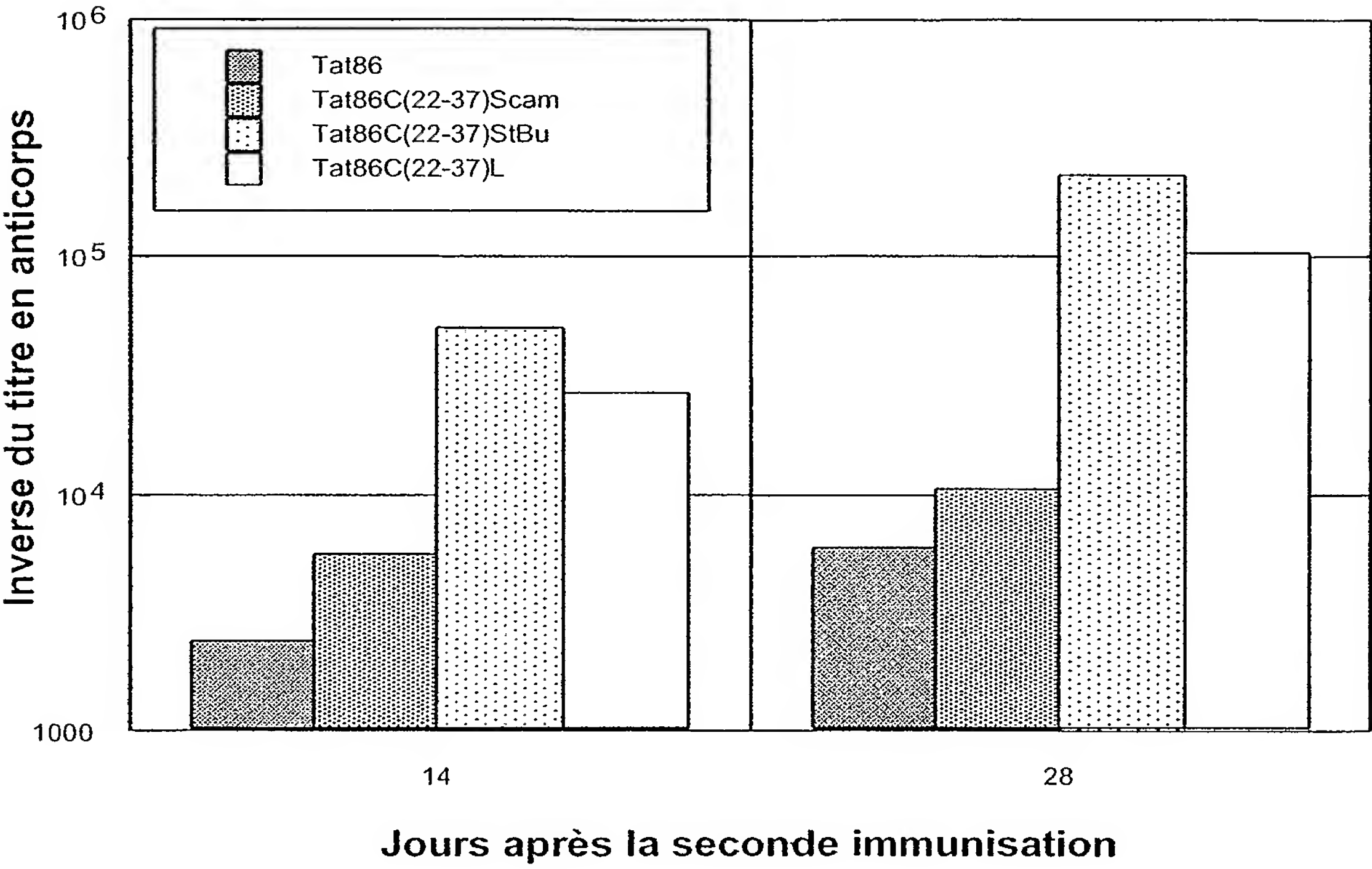


Figure 9

10/19

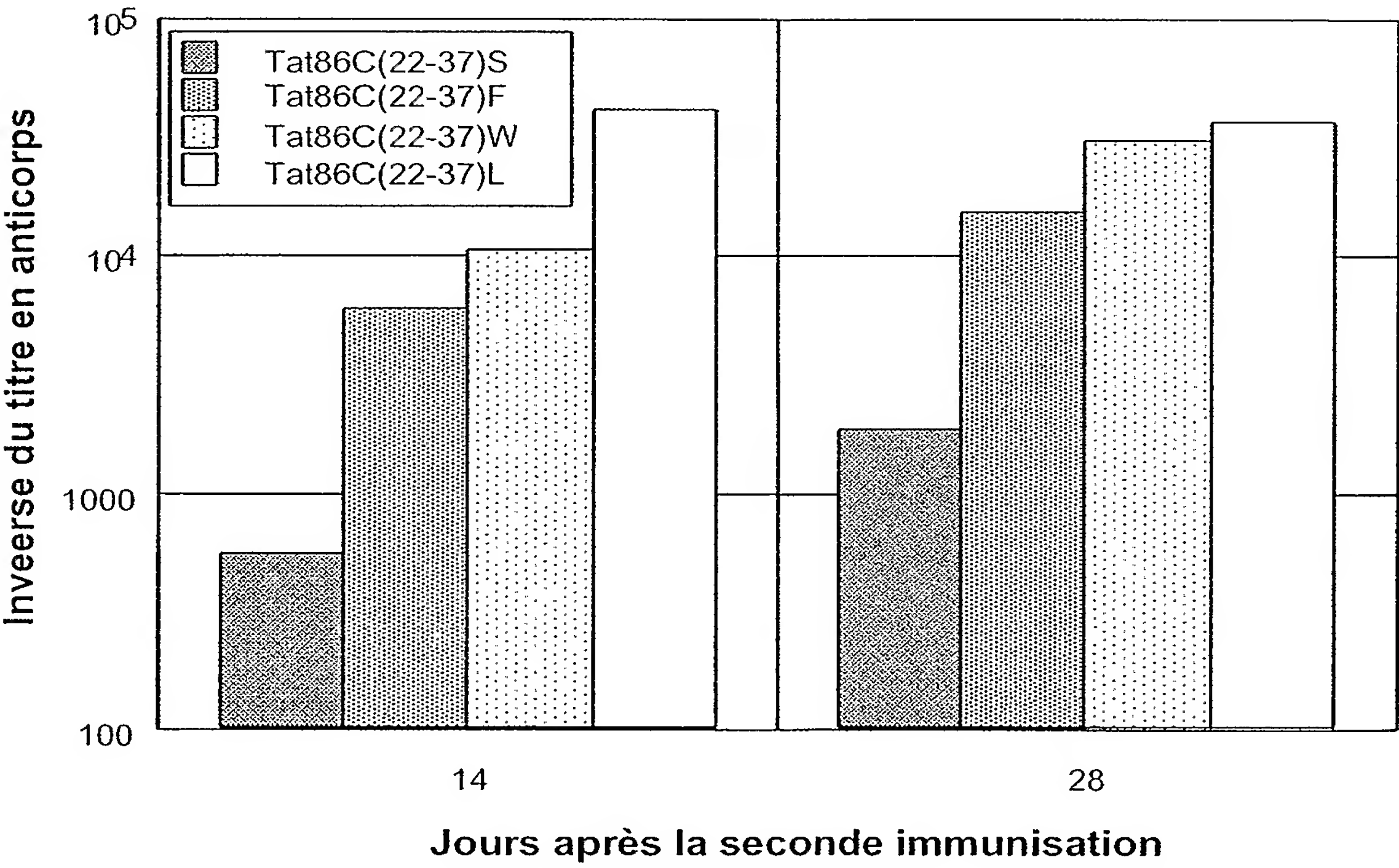


Figure 10

11/19

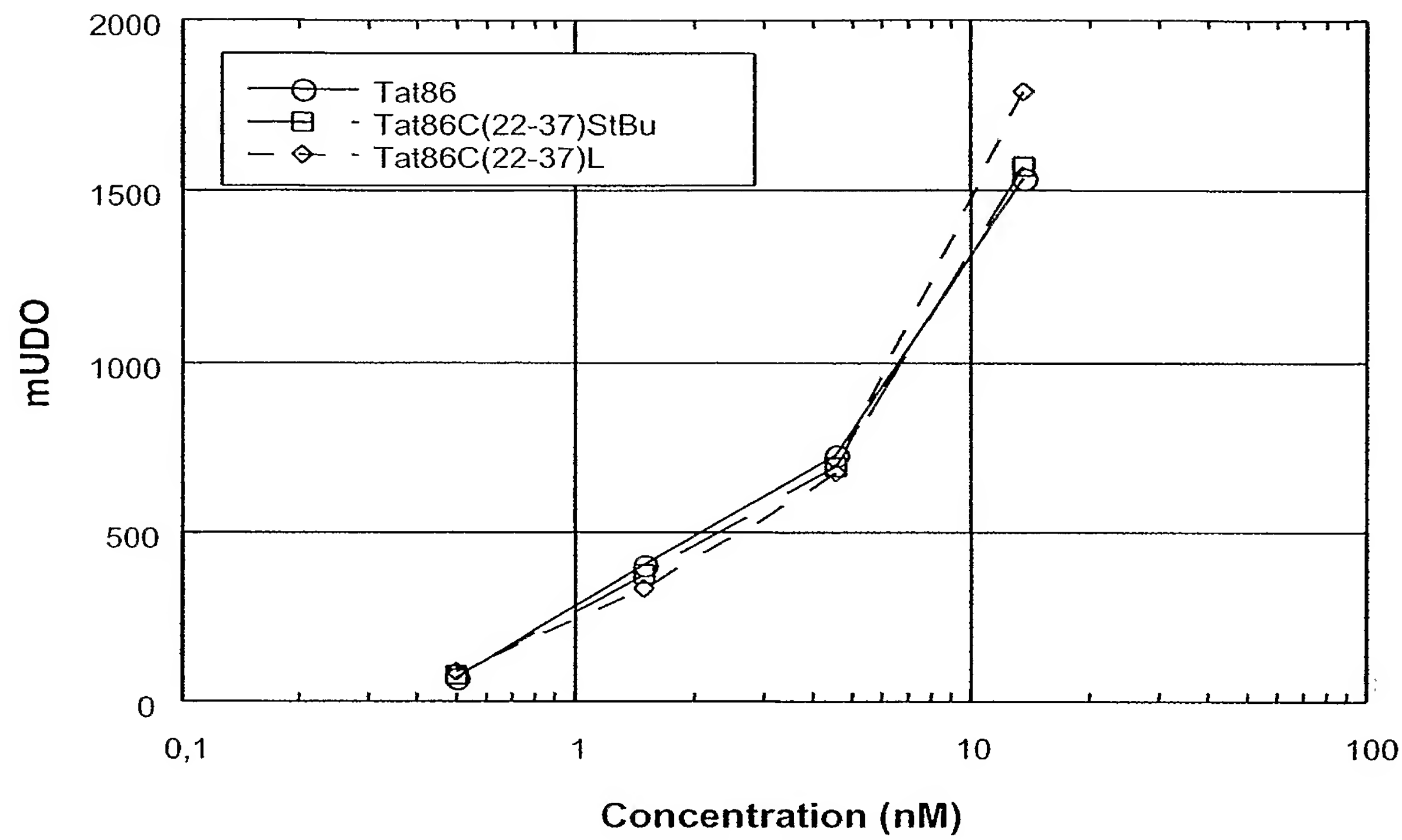


Figure 11

12/19

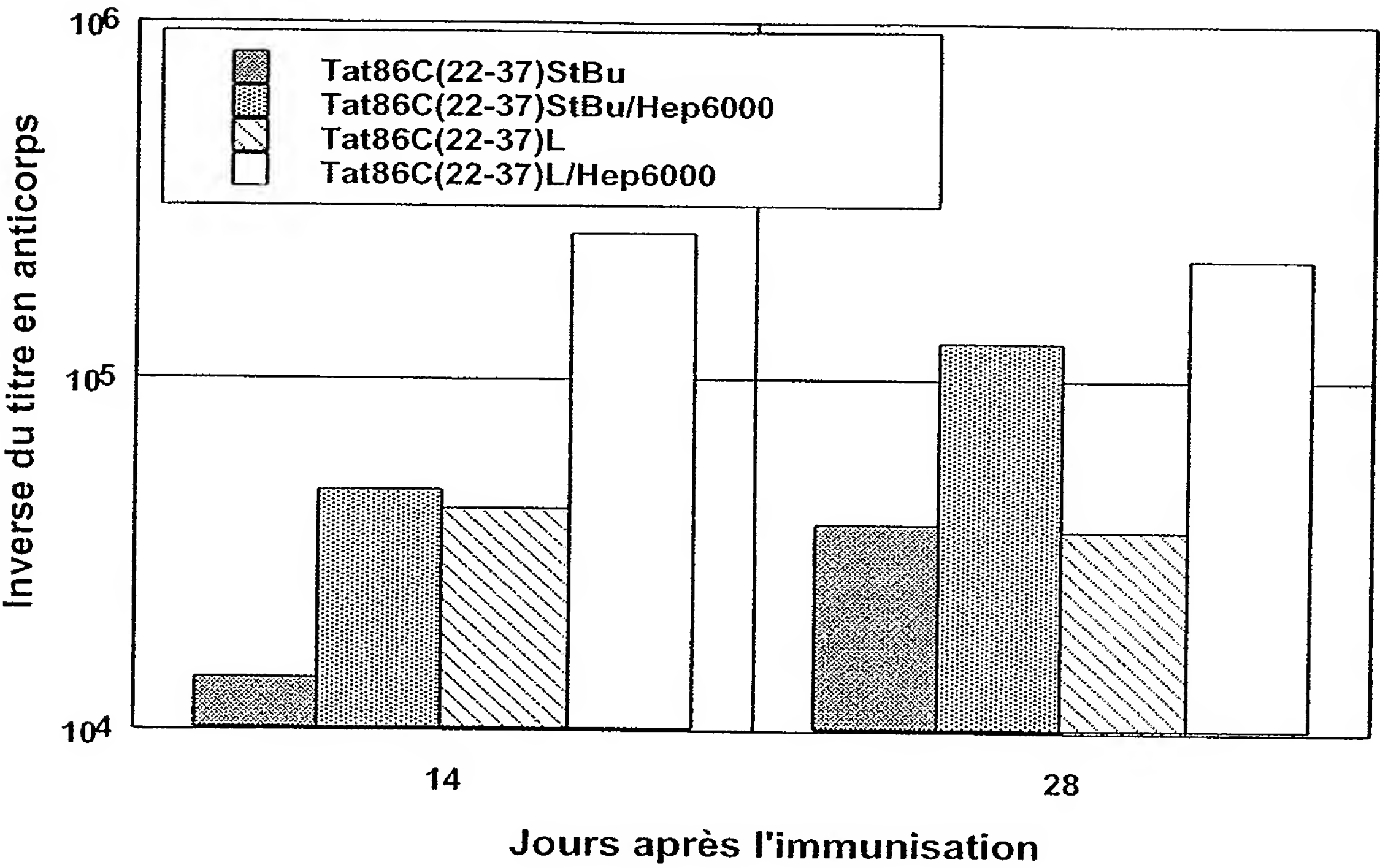


Figure 12

13/19

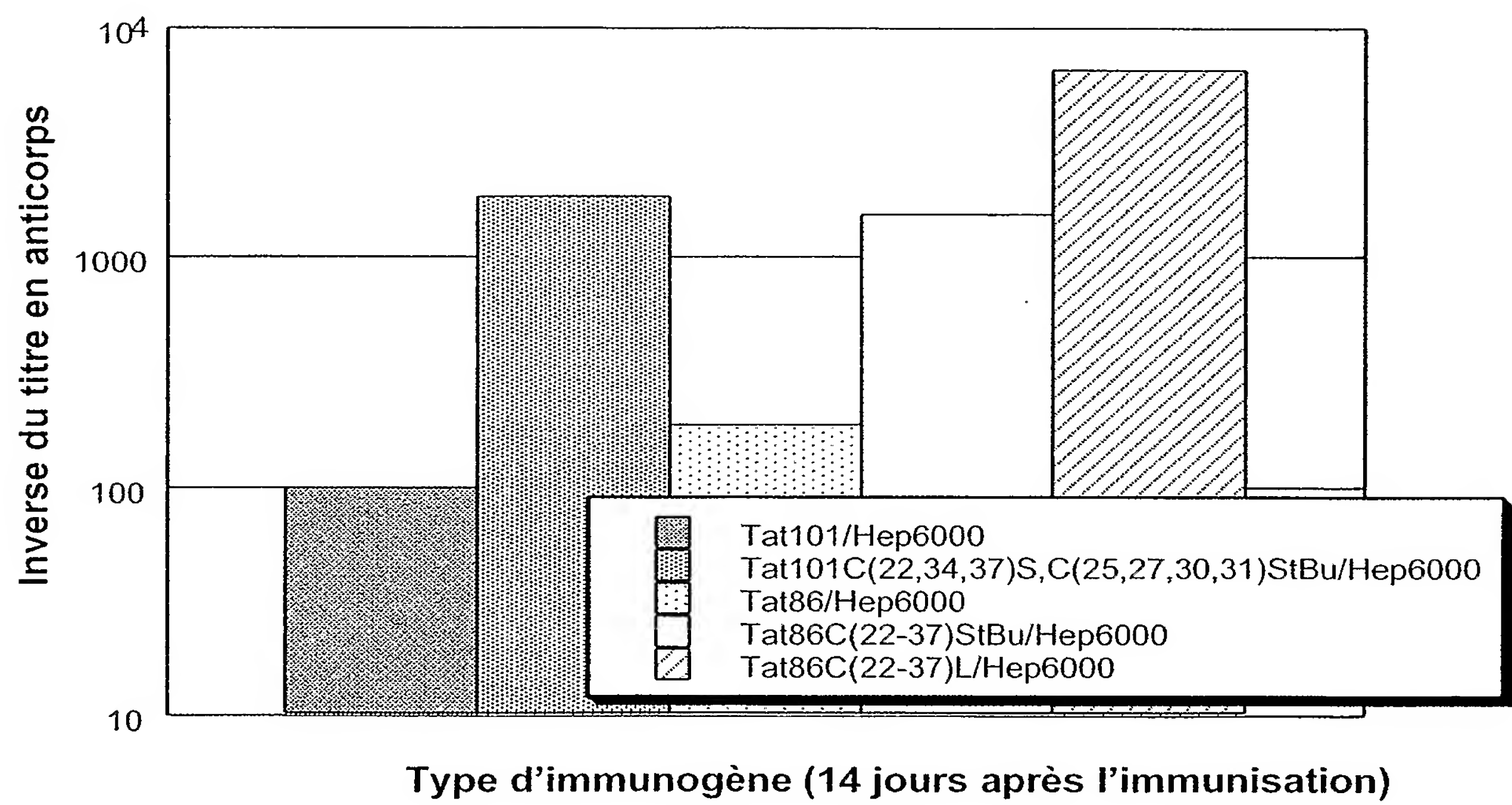


Figure 13

14/19

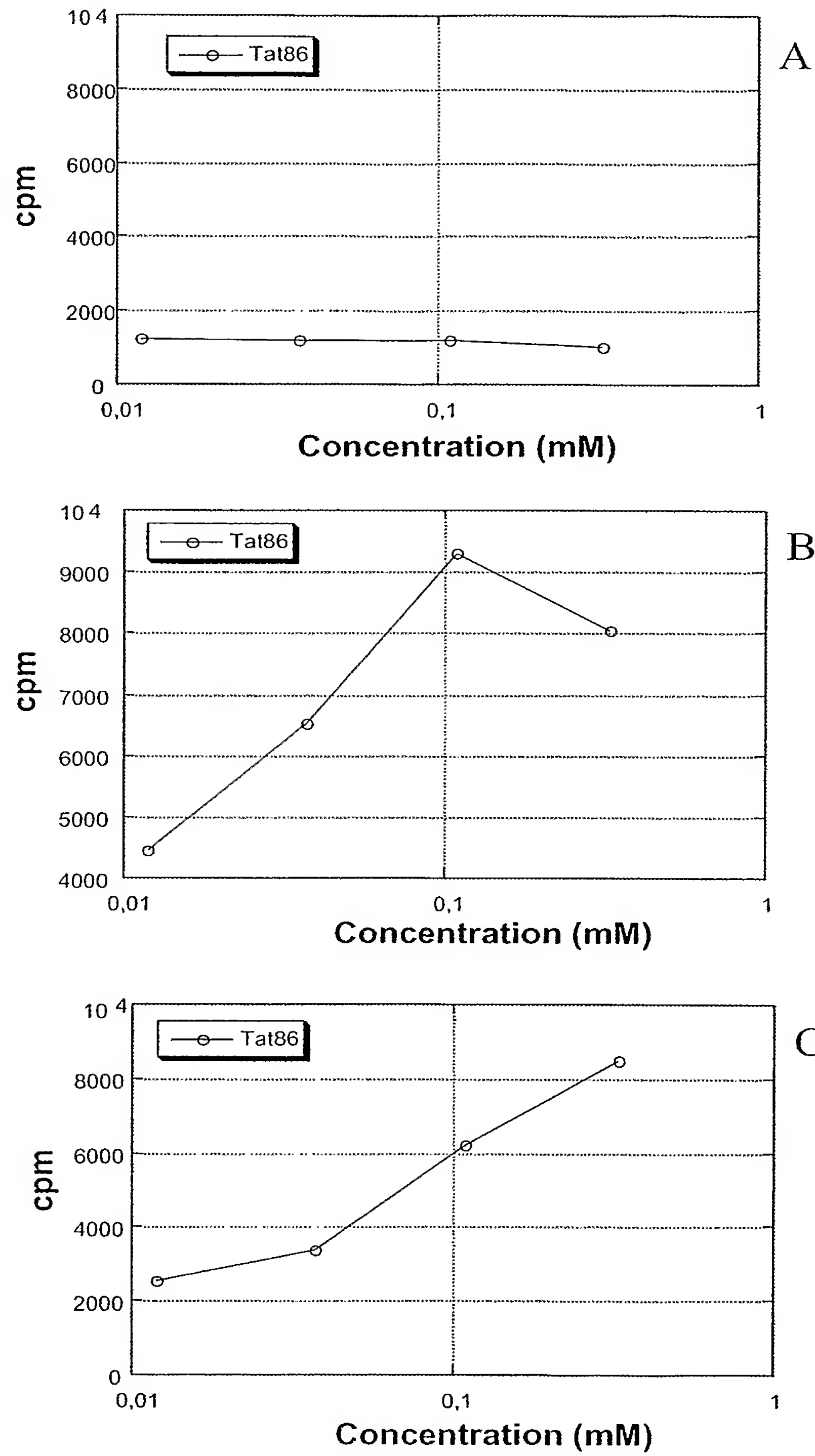


Figure 14

15/19

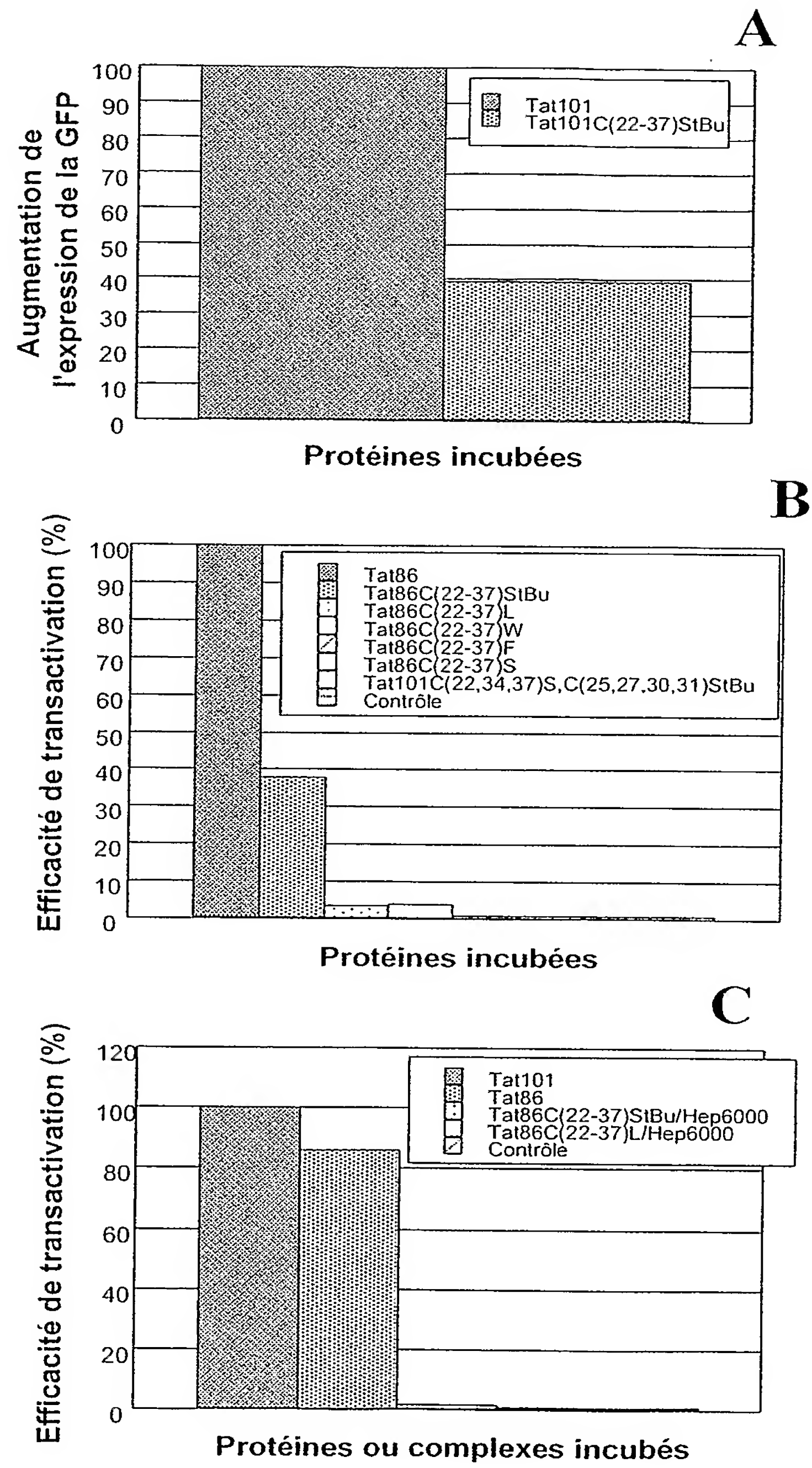


Figure 15

16/19

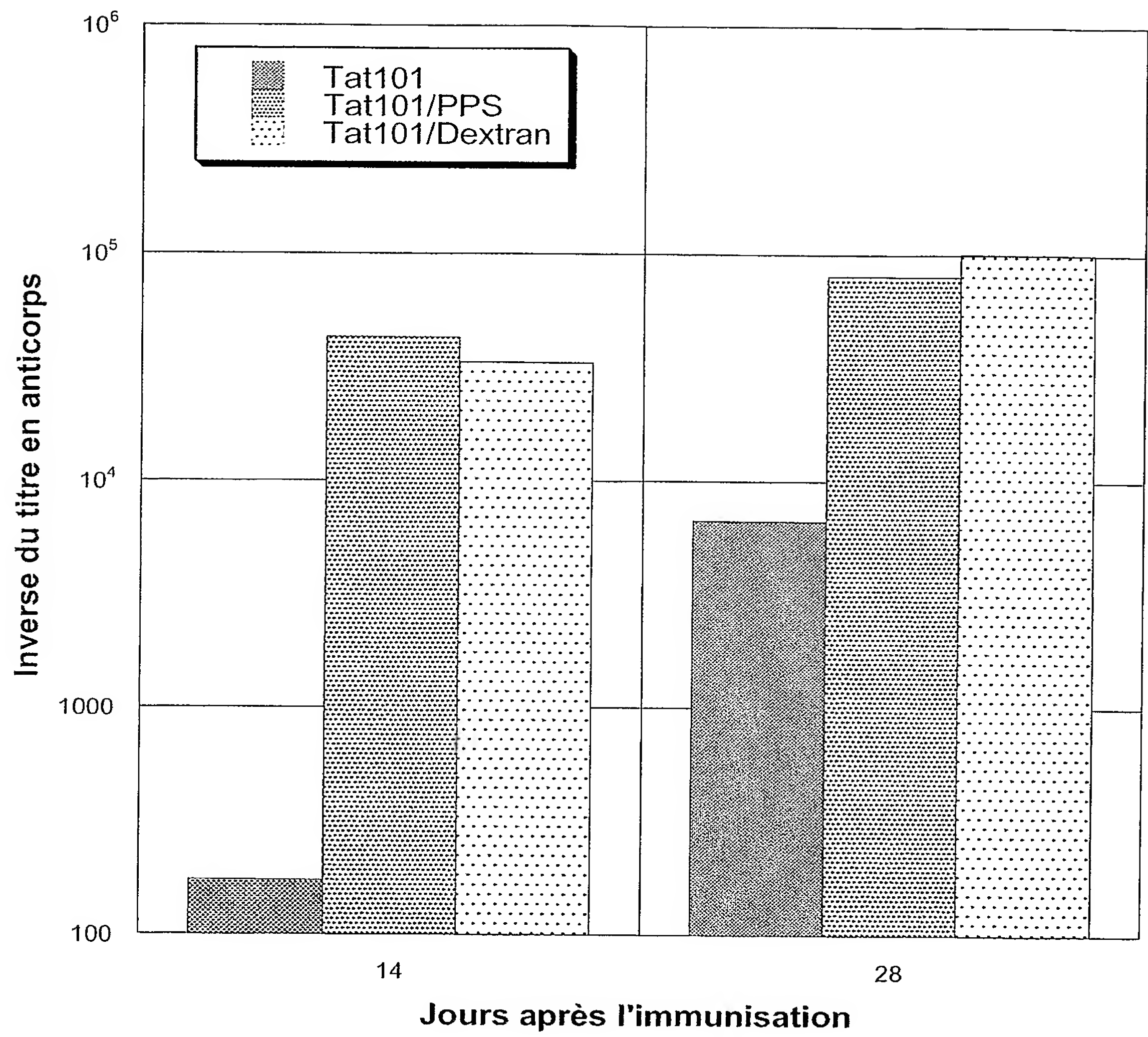


Figure 16

17/19

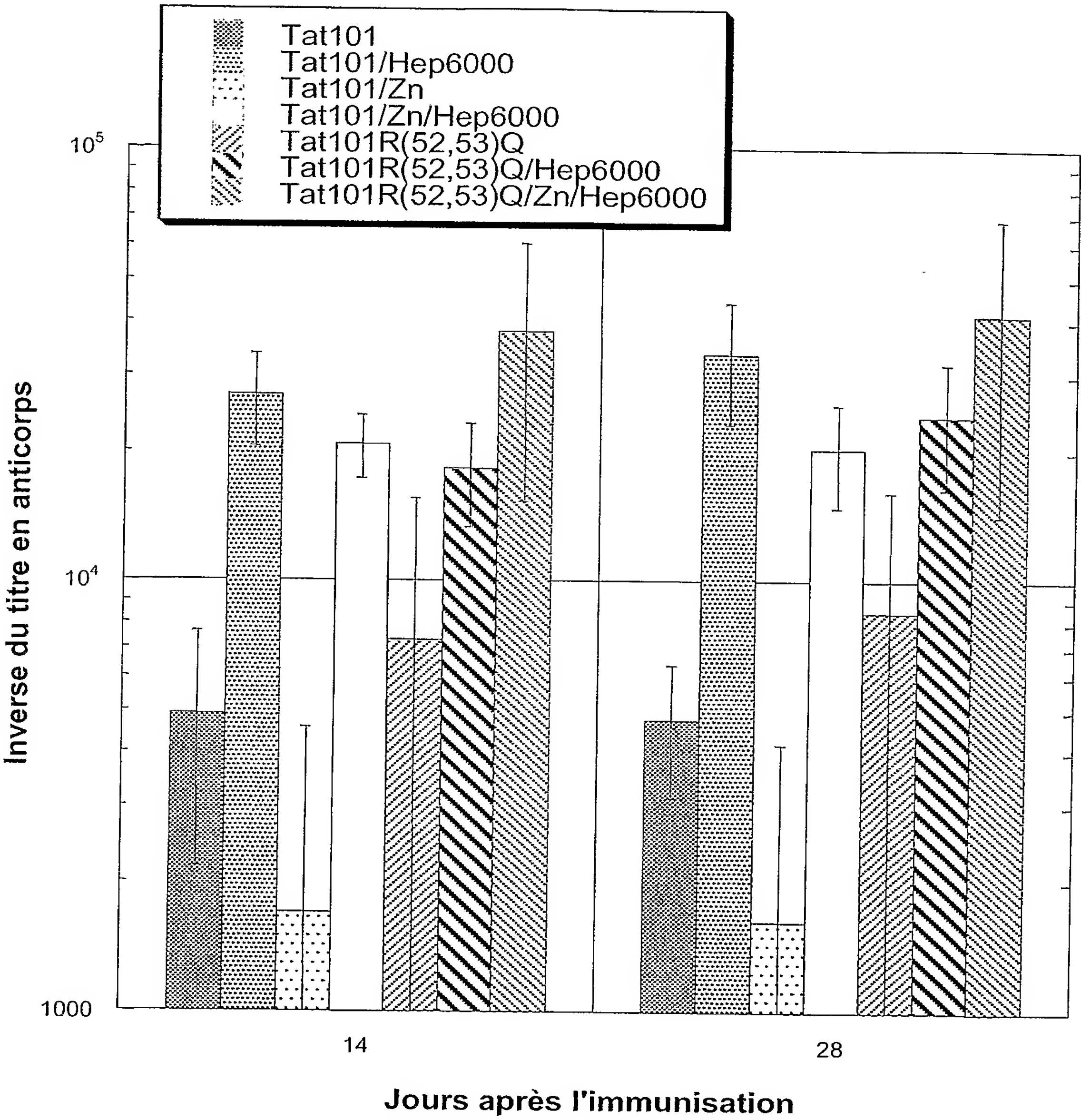


Figure 17



Figure 18

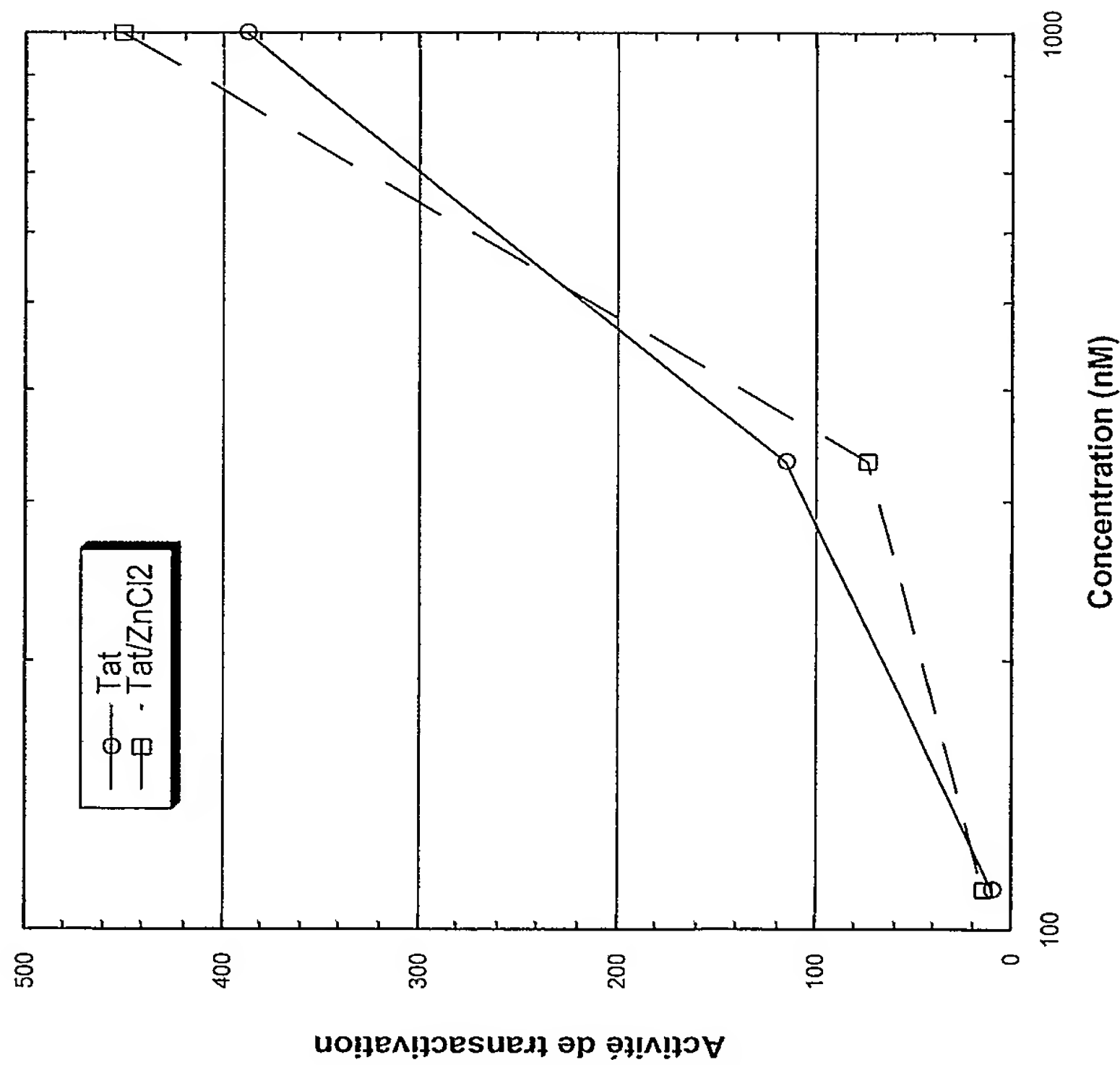


Figure 19

s263FR110.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Commissariat à l'Energie Atomique

DREVET, Pascal

LAJEUNESSE, Evelyne

LECOQ, Alain

LEONETTI, Michel

MENEZ, André

MOINE, Gervaise

THAI, Robert

<120> Antigène Tat stabilisé et ses applications pour la vaccination anti-VIH

<130> s263FR110

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 101

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa= Norleucine

<400> 1

Xaa Glu Pro Val Asp Pro Lys Leu Glu Pro Trp Lys His Pro Gly Ser
1 5 10 15Gln Pro Lys Thr Ala Cys Asn Asn Cys Tyr Cys Lys Lys Cys Cys Phe
20 25 30

s263FR110.ST25

His Cys Gln Val Cys Phe Thr Lys Lys Gly Leu Gly Ile Ser Tyr Gly
35 40 45

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Ala Pro Gln Asp Ser Gln Thr
50 55 60

His Gln Val Ser Leu Ser Lys Gln Pro Ala Ser Gln Pro Arg Gly Asp
65 70 75 80

Pro Thr Gly Pro Lys Glu Ser Lys Lys Lys Val Glu Arg Glu Thr Glu
85 90 95

Thr Asp Pro Val Asp
100